Hemmversuche mit Schwermetallen, organischen Peroxyden und Alkylierungsmitteln an der α-Glycerophosphat-Dehydrogenase in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hans Joachim Nagler

aus Würzburg

1963

7496

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0116

HEMMVERSUCHE MIT SCHWERMETALLEN, ORGANISCHEN PEROXYDEN UND ALKYLIERUNGSMITTELN AN DER α-GLYCEROPHOSPHAT-DEHYDROGENASE IN VITRO UND IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hanns Joachim Nagler
aus Würzburg
1963

R. CHEM.
BIBLIOTHEK
LEIPZIG

Tag der mündlichen Prüfung:	16. Mai 1963
Dekan:	Prof. Dr. G. Möllenstedt
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. G. Weitzel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Graf

Die vorliegende Arbeit enstand in der Zeit vom Februar 1960 bis zum Oktober 1962 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen.

Herrn Professor Dr. Dr. G. W e i t z e l danke ich für die Überlassung des Themas und für die grosszügige Förderung meiner Untersuchungen.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern des Physiologisch-Chemischen Institutes, die mich unterstützten; besonders Herrn Dr. W. S c h a e g und Herrn Dr. F. S c h n e i d e r.

Inhalt

Seite

A. Einleitung und Problemstellung 5
Abkürzungen 8

B. Literaturübersicht 9

C. Substanzen und Methodik 13

D. Ergebnisse und Diskussion

I. 1. Hemmung durch Schwermetalle 15
2. Einfluss des Liganden 20
3. Reaktivierungsversuche des metallgehemmten Enzyms 22
4. Bestimmung des Hemmtyps 26

II. 1. Hemmung durch organische Peroxyde 28
2. Reaktivierung des peroxydgehemmten Enzyms. 33
3. Bestimmung des Hemmtyps 34

III. Hemmung durch alkylierende Substanzen 35

IV. Tierexperimenteller Teil
Substanzen und Methodik 41

V. Ergebnisse der Hemmversuche in vivo 43
1. Hemmung durch Schwermetalle 44
2. Hemmung durch organische Peroxyde 45
3. Hemmung durch alkylierende Substanzen . . 46
4. Einfluss der Zeit auf die Hemmintensität . 46

VI. Gesamtdiskussion
1. Fermenthemmung durch Schwermetallionen . . 48
2. Hemmung durch organische Peroxyde und Peroxyhydrate 50
3. Hemmversuche mit Alkylierungsmitteln . . . 51
4. Tierversuche 52

E. Zusammenfassung 54

F. Literatur 55

A. Einleitung und Problemstellung

Der Wasserstoff organischer Substanzen wird durch bestimmte Fermente, die Dehydrogenasen, aktiviert und reagiert in diesem Zustand mit den Cofermenten. Als Cofermente kommen vor allem die Phosphor-pyridinnucleotide und die Flavinnucleotide in Frage. Sie können den Wasserstoff verschiedener Enzyme übernehmen und weitergeben. Die hydrierten Coenzyme reagieren zum Beispiel mit eisenhaltigen Fermenten, den Cytochromen. Sie werden von den am Eisen aktivierten Sauerstoff oxydiert und geben ihren Wasserstoff weiter.

Eines der wichtigsten Beispiele einer solchen Reaktion ist die Atmungskette. Sie liefert mit ihren Redoxketten die Energie, die nötig ist um aus Adenosinphosphat Adenosintriphosphat zu bilden, das dann als Energiespeicher dienen kann.

Schon aus diesem kurzen Abriss wird die Schlüsselstellung und die grosse Bedeutung der Dehydrogenasen bei der Wasserstoffverschiebung ersichtlich.

Über den genauen Reaktionsmechanismus der Wasserstoffaktivierung und -übertragung kann man allerdings auch heute in der Mehrzahl der Fälle noch keine genaueren Aussagen machen.

Besonders intensiv untersucht sind die gegebenen Möglichkeiten an der Alkoholdehydrogenase. Sie enthält pro Molekül vier[1] bzw. fünf[2] Zinkionen, die vermutlich merkaptidartig gebunden sind. Es wurde vermutet, dass DPN^+ mit Hilfe von Zinkbrücken an die ADH gebunden sei und die Wasserstoffübertragung über derartige Komplexe erfolge. WALLENFELS[3][4] vermutete, dass es sich hierbei um eine Hydridverschiebung handele; die Annahme konnte von MAHLER und DOUGLAS[5] bewiesen werden. Über die Natur dieses ternären Komplexes werden allerdings zwischen den einzelnen Forschungsgruppen um WALLENFELS, KAPLAN[6] und WEITZEL[7] verschiedene Auffassungen vertreten. Auch eine neuere Arbeit von THEORELL und Mc KINLEY Mc KEE[8] konnte keine endgültige Klärung bringen.

Die Schwierigkeiten bei der Untersuchung enzymkatalysierter Reaktionen sind allein schon darin begründet, dass man meist die Struktur der Fermentproteine nicht genau kennt. Dadurch ist es besonders schwierig, die komplizierten Mechanismen zu deuten und das Zusammenwirken verschiedener Reaktionen im lebenden Organismus zu durchschauen.

Seit langem ist die grosse Empfindlichkeit von Enzymen gegen viele chemische Reagenzien, aber auch gegen physikalische Einwirkungen, wie Veränderungen des pH-Wertes oder der Temperatur bekannt. Eine der Hauptschwierigkeiten aber stellt noch immer die Ermittlung der Aminosäure-Sequenz und des räumlichen Aufbaus der Fermentproteine dar.

Man hat deshalb die verschiedensten Wege beschritten, um wenigstens kleine Teile der Enzyme kennenzulernen und diese Teilerkenntnisse zu einem ungefähren Gesamtbild zusammenzusetzen.

Eine viel gebrauchte Methode hierfür ist der schrittweise Abbau der Peptidkette, der schliesslich zur Auffindung des eigentlich aktiven Molekülteils führen kann. Dies wurde bei dem SH-Ferment Papain versucht[45], von dessen 180 Aminosäuren 120 ohne nennenswerte Verringerung der Aktivität abgespalten werden konnten.

Die Untersuchung von abgelösten grösseren Stücken der Proteinkette, wie man sie etwa durch Einwirkung von Proteasen erhalten kann, lässt möglicherweise Schlüsse auf die Tertiärstruktur zu. Wie oben erwähnt, ist sie von besonderer Wichtigkeit, da je nach der räumlichen Lage die eine oder die andere Gruppe Teil eines aktiven Zentrums werden kann.

Zur Erforschung der Enzyme werden zugleich die verschiedensten biochemischen Arbeitsmethoden angewandt. Einen breiten Raum nehmen dabei Experimente ein, in denen durch ausgewählte Stoffe die Tätigkeit der Enzyme hemmend oder aktivierend beeinflusst wird. Man hofft dadurch auf Steuerungsvorgänge im lebenden Organismus schliessen zu können und Aufklärung über die aktiven Zentren zu erhalten. Auch auf Art und Festigkeit der Bindung zwischen Enzym und Coenzym lassen derartige Untersuchungen Schlüsse zu.

In Fortsetzung vorangegangener Arbeiten von WEITZEL und Mitarbeitern[9)10)11)12)13)14)15)] wird in der vorliegenden Arbeit das Verhalten der L-α-Glycerophosphat-Dehydrogenase gegenüber bestimmten Hemmstoffen untersucht.

Die Auswahl der Inhibitoren erfolgte unter dem Gesichtspunkt der Blockierung von Thiolgruppen, denn es steht fest, dass die Glycerophosphat-Dehydrogenase ein SH-Protein ist.

Hieraus ergaben sich drei Untersuchungsbereiche:

1. Die Hemmungsmöglichkeiten durch Schwermetalle, die als Merkaptidbildner bekannt sind, speziell durch Zink.
2. Die Einwirkung von organischen Peroxyden unter besonderer Berücksichtigung ihrer Struktur.
3. Die Hemmung durch verschiedene Alkylierungsmittel.

Zugleich war zu untersuchen ob die erzielten Hemmungen durch geeignete Reaktivatoren aufgehoben werden können. Schliesslich sollten die beobachteten Hemmungen der Enzymaktivität näher untersucht und die jeweiligen Hemmungstypen bestimmt werden.

Im zweiten (tierexperimentellen) Teil dieser Arbeit werden die Ergebnisse der in vitro-Versuche daraufhin untersucht ob und in welchem Masse sie auch für die wesentlich komplexeren Verhältnisse des lebenden Organismus Gültigkeit besitzen.

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

ADH = Alkoholdehydrogenase aus Leber

DPN^+ = Diphosphorpyridinnucleotid, oxydierte Form

DPNH = Diphosphorpyridinnucleotid, reduzierte Form

DOAP = Dioxyacetonphosphat

GAPDH = Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

α-GDH = Glycerophosphat-Dehydrogenase oder Baranowski-Enzym

G-1-P = Glycerin-1-Phosphat

LDH = Lactatdehydrogenase

PCMB = Parachlormercuribenzoat

TPE = Triosephosphatester

TRA = Triäthanolamin

B. Literaturübersicht

Die Glycerophosphat-Dehydrogenase steht an einer entscheidenden Stelle des Stoffwechsels. Sie schlägt die Brücke vom glykolytischen Abbau der Kohlenhydrate zu den Reaktionen des Fettaufbaus. Sie kann die, aus der Aldolasereaktion erhaltenen C_3-Bruchstücke in den Lipidmetabolismus einschleusen.

Zum ersten Male konnte MEYERHOF[17] im Jahre 1919 die Wirkung einer Glycerophosphat-Dehydrogenase beobachten, als er fand, dass die Atmung homogenisierter Froschmuskulatur durch Zugabe von Glycerinphosphat erheblich gesteigert werden kann.

1936 isolierte GREEN[18] diese Dehydrogenase und stellte fest, dass sie ein an Mitochondrien gebundenes Flavinenzym und DPNH-unabhängig ist. In den folgenden Jahren führten GREEN und seine Mitarbeiter diese Forschungen fort[18)19)20]. Sie stellten die Reaktionsgleichung auf, die von LARDY[21] und mehreren anderen Laboratorien[22)23)24] bis in alle Einzelheiten belegt worden ist.

Fast zur selben Zeit, als GREEN das strukturgebundene Enzym isolierte, gelang von EULER und Mitarbeitern[25] der Nachweis einer anderen Glycerophosphat-Dehydrogenase in verschiedenen tierischen Geweben. Sie isolierten dieses Enzym und fanden im Vergleich mit dem Meyerhof-Green'schen Flavinenzym, dass es nicht strukturgebunden und streng DPNH abhängig ist.

Diese p-GDH ist im menschlichen Organismus in den bisher höchsten Konzentrationen in der Leber und in der Muskulatur gefunden worden[26]. In grösseren Mengen ist sie, ihrer Aufgabe entsprechend, auch im Fettgewebe und in der Nierenrinde enthalten.

Die Darstellung des Enzymproteins erfolgt aus Kaninchenmuskulatur. Die Verteilung der Enzymaktivitäten über die einzelnen Organe des Kaninchens ist ähnlich wie beim Menschen. Es wurde festgestellt, dass der Enzymspiegel im Fettgewebe

starken Schwankungen unterliegt[46].

Nach neueren Untersuchungen wurde die α-GDH im Cytoplasma von Insektenmuskeln, besonders im Flugmuskel der Wanderheuschrecke (Locusta migratoria) in auffallend hoher Konzentration gefunden[23][27]. Der Gehalt ist hier fast zehnmal höher als in Rattenmuskulatur[36].

Dagegen ist die α-GDH im Tumorgewebe in besonders geringer Menge vorhanden[36].

Aus dem aktiven Oberflächenmycel[28] eines sogenannten Fettpilzes, Endomycopsis vernalis, wurde ebenfalls eine α-GDH extrahiert.

In kristallisierter Form wurde das Enzym zum ersten Mal von BARANOWSKI[29] aus Kaninchenmuskel dargestellt; seither wird es deshalb auch häufig Baranowski-Enzym genannt. Aus Myogen A, einem Gemisch von Aldolase und α-GDH, erhielt er durch fraktionierte Kristallisation rhombische α-GDH-Kristalle.

Er bestimmte für sein Enzym eine Wechselzahl von 26 000 Molekülen DOAP/min. bei 20°C und pH 7,0 pro 100 000 g Protein und bei pH 7,0 und 20°C eine Gleichgewichtskonstante von $1{,}4 \cdot 10^4$ für Glycerophosphat als Substrat.

Zweckmässiger und mit wesentlich höherer Ausbeute arbeitet man heute nach der Methode von BEISENHERZ et al.[30], die es ermöglicht α-GDH neben einigen anderen wichtigen Enzymen in einem Arbeitsgang aus Kaninchenmuskel kristallin herzustellen.

Im Jahre 1959 wurden erstmals Versuche unternommen, die Struktur des Baranowski-Enzyms aufzuklären. VAN EYS und Mitarbeiter[31] behandelten das Enzym mit Kohle, da sie wegen des atypischen Proteinspektrums im ultravioletten Bereich eine mit dem Enzym verbundene Komponente vermuteten, die keinen Proteincharakter hat. Der Nachweis gelang durch Vergleich des Spektrums von Kohlebehandeltem und „nativem" Enzym. So zeigte sich weiter, dass das kohlebehandelte Enzym fast die gleiche enzymatische Aktivität aufweist wie das unbehandelte Enzym.

Der Nichtproteinanteil, der weder als DPN^+ noch als DPNH identifiziert werden konnte, ist nach VAN EYS, für eine zweite, bisher unbekannte Wirkungsweise des Enzyms verantwortlich.

Die Glycerophosphat-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion:

$$\text{Dihydroxyaceton-P} + \text{DPNH} + H^+ \rightleftharpoons \text{Glycerin-P} + DPN^+$$

VAN EYS konnte die Rückreaktion bei pH 9,3 durch etwa 1 Mol PCMB/Mol Protein oder durch N-Äthyl-maleinimid völlig und durch Jodacetat zu 23 Prozent hemmen. Die Konzentrationen betrugen in allen drei Fällen $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.

Die SH-Gruppen-Bestimmung nach der Methode von GUNNINGHAM[33] ergab Werte von 3,8 bzw. 2,15 SH-Gruppen für das unbehandelte bzw. das nucleotidfreie Protein.

Es wurden weiterhin die Sedimentationskonstante, die Diffusionskonstante und das scheinbare spezifische Volumen gemessen.

Das Molekulargewicht des Proteins wird von VAN EYS mit 78 000 angegeben.

Fast gleichzeitig und unabhängig von den amerikanischen Autoren haben sich ANKEL, BÜCHER und CZOK[35] mit dem gleichen Problem beschäftigt. Ihre Untersuchungen bestätigen teilweise die oben genannten Ergebnisse.

Das freie Enzymprotein wurde von ihnen kristallin dargestellt und die Konstitution der an Kohle adsorbierten Komponente untersucht. Die Verfasser fanden, daß es sich um eine dieser Verbindung sehr nahe stehende Derivat sein müsse.

Das Molekulargewicht wurde zu 70 000 bestimmt. Die Sedimentationszahlen für das nucleotidhaltige Protein und für das kohlebehandelte lagen beide bei etwa 5,2 S (1 % Protein/Min bei 25°C.

Für die umgekehrte Reaktionsrichtung in Gegenwart von Hydrazin liegt der Wert bei nur 1,5 S (1 % Protein/Min).

Bei beiden Enzympräparationen wirkt ADP aktivierend.

Eine SH-Gruppenbestimmung bei pH 7,0 nach der Methode von BOYER[34] ergab 14,8 - 15,2 SH-Gruppen pro Molekül für das native und 13,5 - 16,4 für das kohlebehandelte Ferment. BÜCHER und Mitarbeiter schlossen daraus auf eine Bindung der Nichtproteinkomponente über eine SH-Gruppe an das Ferment.

Die bisher umfassendste Arbeit über chemische und physikalische Eigenschaften der kristallinen α-GDH stammt von YOUNG und PACE[35].

Aus ihrer Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der α-GDH-katalysierten Reaktionen geht hervor, dass die Reduktion des DOAP gegenüber der Oxydation des Glycerin-phosphates etwa hundertfach bevorzugt abläuft. YOUNG und PACE postulieren, dass die DPN-abhängige α-GDH den Reduktionsvorgang, das an Zellpartikel gebundene Meyerhof-Green'sche Enzym vorwiegend die Oxydation katalysiert.

Im weiteren Verlauf ihrer Arbeit bestimmen die Autoren die Sedimentationskonstanten, das scheinbare spezifische Volumen, die spezifische Viskosität, Temperatur- und pH-Empfindlichkeit und angenäherte Michaeliskonstanten.

Das Molekulargewicht geben sie mit 173 000 an und stehen damit, wie auch mit einigen anderen Werten im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitskreise um VAN EYS und BÜCHER.

In einer Arbeit über die Wege des Wasserstoffs in der lebenden Organisation diskutieren BÜCHER und KLINGENBERG[36] eine neue biologische Funktion der α-GDH.

Angeregt durch Arbeiten ZEBEs[37], der fand, dass ein Homogenat von Insektenflugmuskeln Glycerin-1-Phosphat wesentlich intensiver veratmet als andere Substrate, untersuchten verschiedene Arbeitskreise die Funktionen der Enzyme, die Glycerin-1-Phosphat umsetzen[23][24][38][39][40].

BÜCHER und KLINGENBERG fassten ihre Ergebnisse zur Formulierung eines Glycerin-1-Phosphat-Zyklus zusammen. Da nach LEHNINGER[41] die Doppelmembran der Mitochondrien für exogenes DPNH impermeabel ist, wäre somit dem Wasserstoff, der durch Reduktion von Dioxyacetonphosphat mit Hilfe der α-GDH entsteht, eine unüberbrückbare Schranke gesetzt. Dagegen kann aber das entstehende Glycerin-1-Phosphat in den mitochondrialen Raum eindringen, wo es von dem strukturgebundenen Meyerhof-Greenschen Enzym wieder zu DOAP oxydiert wird.

Auf diese Weise kommt ein Reaktionszyklus zustande, der letzten Endes Wasserstoff aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien bringt und der Atmungskette zuführt. Nach BÜCHERs Be-

rechnungen wird im Flugmuskel der Wanderheuschrecke der gesamte im Cytoplasma entstehende Wasserstoff auf diesem Wege in die Mitochondrien geschleust.

C. Substanzen und Methodik

α-GDH aus Kaninchenskelettmuskel, Kristallsuspension in 2,0 m Ammonsulfatlösung; 3-Phosphorglycerat, kristallisiert als tri Cyclohexylammoniumsalz x 3 H_2O; Triosephosphatester, Natriumsalze eines Gemisches von Dihydroxyaceton- und Glycerinaldehydphosphorsäure; DPN und DPNH; Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber, Kristall-suspension in 2,5 m Ammonsulfatlösung, sämtlich Präparate der Fa. C.F. Lehringer u. Soehne GmbH, Mannheim.

Weiter wurden verwendet:
PCMB der Fa. Karl Roth, Karlsruhe. Jodacetat der Fluka AG Buchs, zweifach umkristallisiert aus H_2O, F = 85°; Jodacetamid von Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, zweifach umkristallisiert aus einem Tetrachlorkohlenstoff-Alkoholgemisch, F = 94°; N-Äthylmaleinimid der Fa. Dr. E. Schuchardt OHG, München und der Fa. Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, zweifach umkristallisiert aus Benzol.

Weitere Alkylierungsmittel und Peroxyde wurden in dankenswerter Weise von Herrn Dr. F. SCHNEIDER (Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen) überlassen.

Nähere Angaben über Inhibitoren siehe auch [1] und in vorl.

Die Fermentaktivitäten wurden in optischen Tests nach WARBURG[24] bei 25°C und 366 mμ im Eppendorf-Photometer und im Zeiss Spektralphotometer PMQ II gemessen.

Substrat war TPE und DPNH Cofermentat, siehe hierzu auch Biochemica Boehringer Information, August 1959.

Bestimmung der ADH-Aktivität nach Biochemica Boehringer Information Januar 1961.

Der Standardansatz zur Bestimmung der α-GDH-Aktivität hatte folgende Zusammensetzung:

2,6 ml TRA-Puffer m/20, pH 7,6; DPNH $2 \cdot 10^{-4}$ m; DOAP $2,7 \cdot 10^{-4}$ m; bis zu 0,3 ml Inhibitorlösung und bis zu 0,3 ml H_2O quarzbidestilliert, zusammen immer 0,3 ml; Endvolumen 3,0 ml.

Variationen des Tests werden im Text angegeben.

Nachdem die Extinktion um 0,05 zugenommen hat wird die Zeit abgestoppt, die nötig ist um die Extinktion um weitere 0,1 Einheiten zu steigern.

Für die Rückreaktion, für die 3-Phosphorglycerat Substrat ist, wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

G-1-Phosphat $2 \cdot 10^{-2}$ m ; DPN $1 \cdot 10^{-3}$ m ; Glykokoll-Hydrazin-Puffer pH 9,8.

Auch hier wurde, nachdem die Extinktion um 0,05 angestiegen war, die Zeit gestoppt, in der die Extinktion um weitere 0,1 Einheiten anstieg.

Die Versuche mit N-Äthylmaleinimid wurden am registrierenden Zeiss Photometer RPQ 20 A durchgeführt.

Die Bestimmung der Hemmungstypen erfolgte nach der graphischen Methode von LINEWAVER und BURK[42].

D. Ergebnisse und Diskussion

I. 1. Hemmung durch Schwermetalle

Als Schwermetallhemmstoffe wurden die Acetate von Kobalt, Kupfer, Nickel, Zink und Cadmium verwendet; lediglich Quecksilber wurde als p-Chlor-mercuribenzoat eingesetzt. Orientierende Messungen mit den entsprechenden Sulfaten ergaben keine Abweichungen.

Die Abbildungen 1-3 zeigen die Abnahme der α-GDH-Aktivität mit steigender Schwermetallkonzentration.

a) PCMB und Kupfer

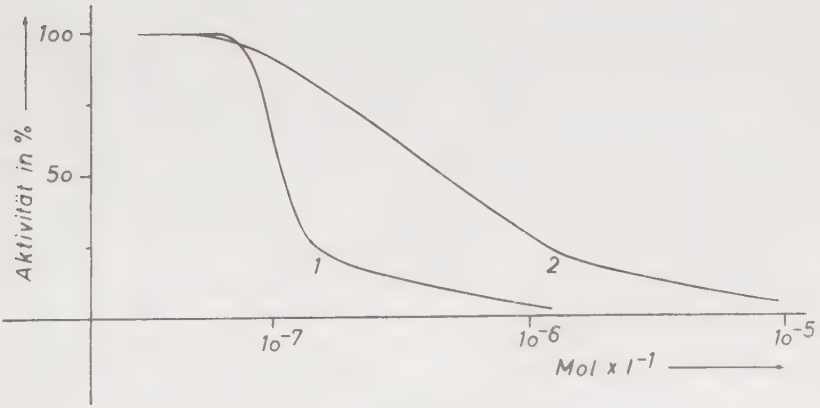


Abb.1. Hemmung durch PCMB = Kurve 1; Kupfer = Kurve 2; Standardansatz in der Reihenfolge: TRA, TPE, DPNH, Inhibitor, Start mit Enzym; pH 7,6; 25°C.

Die Hemmwirkung von PCMB ist von besonderem Interesse, da diese Quecksilberverbindung als spezifischer SH-Gruppen-Hemmstoff gilt. Wie aus Abb.1 hervorgeht ist die α-GDH aus Kaninchenskelettmuskel gegen diesen Stoff ausserordentlich empfindlich.

Auffällig ist der steile Verlauf der PCMB-Hemmkurve. Bei einer Konzentrationserhöhung um nicht ganz eine Zehnerpotenz fällt die Enzymaktivität von ihrem Maximum auf Null ab.

Kupfer, das ebenfalls sehr stark hemmt, ergibt eine flachere Hemmkurve. Zur vollständigen Hemmung muss die Inhibitorkonzentration, im Vergleich zu PCMB, auf das zwanzigfache erhöht werden.

b) Zink und Nickel

Diese beiden Schwermetalle bilden auf Grund ihrer etwa gleichen Hemmintensität eine weitere Gruppe.

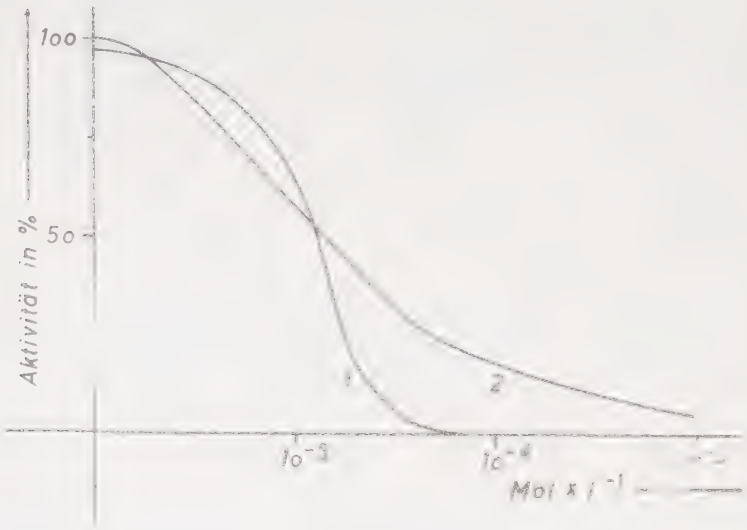


Abb.2: Hemmung durch Zink = Kurve 1 und Nickel = Kurve 2. Reaktionsbedingungen wie in Abb.1.

In Abb.2 fällt besonders die starke Wirkung des Zinks auf, das als mercaptidbildendes Metall in allen Zellen vorkommt.

Während die Zinkhemmung nur langsam zunimmt um dann von Konzentrationen von etwa $5 \cdot 10^{-6}$ m an schnell grösser zu werden, steigt die Hemmung durch Nickel kontinuierlich bis zum Maximum an.

c) Cadmium und Kobalt

Von den beiden vorher erörterten Metallen unterscheidet sich Kobalt durch bedeutend schwächere Inhibitorwirkung.

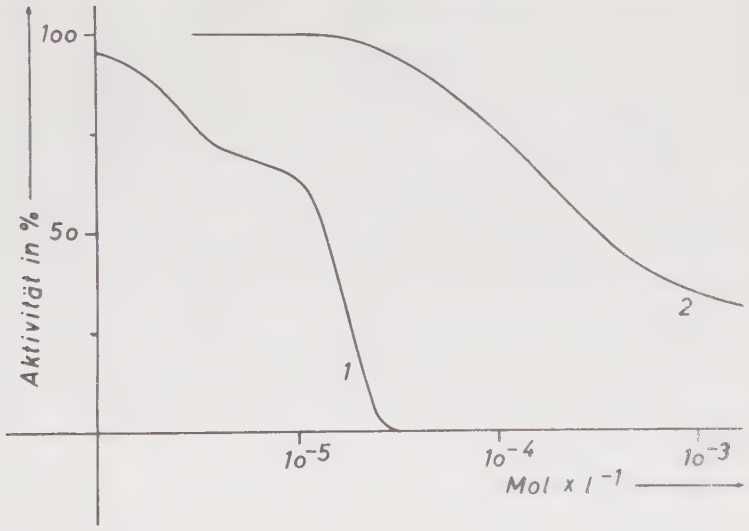


Abb.3. Hemmung durch Cadmium = Kurve 1 und Kobalt = Kurve 2. Reaktionsbedingungen wie in Abb 1.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Es ist eine deutliche Wirkungsabstufung zu erkennen. PCMB und Kupfer zeigen die bei weitem stärkste Hemmwirkung. Auffällig ist die starke Wirkung von Zink, das hier zwischen Nickel und Cadmium liegt. Diese drei Metalle bilden eine unter sich

recht eng zusammenliegende Gruppe. Mit deutlichem Abstand folgt das Kobalt.

Tab.1. 50-proz. und 100-proz. Hemmung durch Schwermetalle

Hemmstoff	Hemmung	
	50 %	100 %
PCMB	$1{,}1 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}
Cu	$4{,}5 \cdot 10^{-7}$	10^{-5}
Ni	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$	10^{-3}
Zn	$1{,}5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
Cd	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$
Co	$4{,}5 \cdot 10^{-4}$	10^{-2}

Zur Beurteilung der Inhibitorwirkung ist es günstiger die 50-proz. Hemmung heranzuziehen, da der genaue Punkt der 100-proz. Hemmung nicht genau festzulegen ist.

Die Mercaptidbildung und damit die Hemmung tritt mit allen verwendeten Metallen praktisch momentan ein; eine Steigerung der Hemmwirkung durch Vorinkubation ist nur in begrenztem Masse möglich. Einzige Ausnahme ist PCMB, das bei längerer Einwirkung die Aktivität des Enzyms noch bedeutend stärker hemmt. Tabelle 2 zeigt die Beeinflussung der Hemmwirkung durch Vorinkubation.

Schon nach einer Vorinkubation von einer Minute kann die PCMB-Konzentration um ein Drittel schwächer gewählt werden, wenn das Enzym zu 50 % gehemmt werden soll; nach zehn Minuten ist nur noch der zwanzigste Teil nötig. Auch beim Kupfer ist eine Steigerung der Hemmwirkung in Abhängigkeit zur Zeit zu beobachten. Sie macht in diesem Fall allerdings nur mehr 25 % aus. Bei allen anderen Metallen liegt die Veränderung innerhalb der Fehlergrenze der Methode.

Tab.2. Zeitabhängigkeit der Schwermetallhemmung

Hemmstoff	Hemmung zu 50 %		
	0,5 min	1 min	10 min
PCMB	10^{-7}	$6{,}6 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-9}$
Cu	$4 \cdot 10^{-7}$	$1{,}2 \cdot 10^{-7}$	10^{-7}
Ni	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	10^{-5}
Zn	$9 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-6}$
Cd	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}
Co	$4{,}3 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$

Die eingesetzten Schwermetalle können nicht nur mit dem Enzymprotein reagieren, sondern möglicherweise auch mit anderen Bestandteilen des Ansatzes. TRA kann hier wegen seines geringen Metallbindungsvermögens vernachlässigt werden; in Frage kommen DPNH und DOAP.

DPNH bildet nur sehr schwache Metallkomplexe[45]. Zwar sind nur Stabilitätskonstanten für DPN^+ bestimmt worden, da aber das Metall höchstwahrscheinlich über die Phosphorsäurereste gebunden wird, können oxydiertes und reduziertes Nucleotid miteinander verglichen werden.

Die einzige in Frage kommende Komponente des Reaktionsansatzes, die Schwermetall binden könnte ist DOAP. In der Literatur fehlen nähere Angaben; in eigenen orientierenden Versuchen konnte jedoch festgestellt werden, dass DOAP Schwermetall in relativ grossen Mengen binden kann. Die PCMB-Hemmung wird hiervon am wenigsten betroffen.

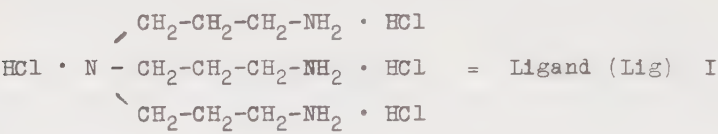
Berücksichtigt man jedoch das grosse Schwermetallbindungsvermögen der im Enzymmolekül vorhandenen Thiolgruppen, so kann DOAP höchstens als Schwermetalldepot wirken. Es zieht zwar Metall an sich, ist jedoch der Schwermetallaffinität des Fermentes unterlegen. Ist eine gewisse Zeitspanne vorhanden bis sich dieses Gleichgewicht eingestellt hat, so wird immer die Ferment-Metallreaktion der begrenzende Faktor sein. Die bei Sofortstart gemessene Hemmung ändert sich bei Verlängerung

der Inkubationszeit nur unwesentlich. Die gewonnenen Werte sind relativ genau und in jedem Falle zum Vergleich untereinander geeignet.

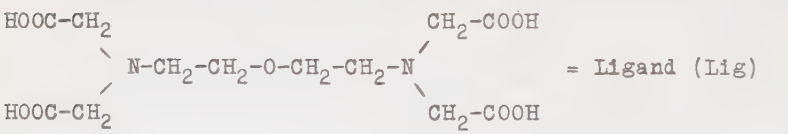
Insgesamt gesehen, geht aus den noch wirksamen Grenzverdünnungen der geprüften Metalle die hohe Empfindlichkeit der α-GDH gegen Mercaptidbildung hervor.

2. Einfluss des Liganden

Es wurden Hemmversuche mit Komplexen des Kupfers und Zinks unter Verwendung folgender Liganden ausgeführt.



Triamino-tripropylamin . 4 HCl



Diamino-diäthyläther-tetraessigsäure

Ausserdem Cystein, SO_4^{2-}, Acetat und Äthylendiamintetraessigsäure.

In Tabelle 3 wird die Veränderung der Hemmwirkung als Funktion des Liganden dargestellt.

Daraus ergibt sich, dass mit steigender Komplexstabilität die Hemmwirkung abnimmt. Als besonders wirksam erwies sich ÄDTA, das mit dem Zink ausserordentlich stabile Komplexe bildet, die 1:1 Struktur besitzen. Die sterischen Verhältnisse für das Zink-Komplexonat sind so günstig, dass die Bildung eines gemischten Komplexes Enzym-Zink-Komplexon unwahrscheinlich erscheint. Diese Möglichkeit der Enzymhemmung wäre bei anderen verwendeten Liganden neben der geringeren Stabilität der

Komplexe denkbar.

Zink-Cystein hemmt nur wenig schwächer als Zinksulfat, da hier gemischte Komplexe möglich sind.

Tabelle 3. Veränderung der Hemmung mit dem Liganden

Hemmstoff	Hemmung 50 %
$CuSO_4$	$4{,}5 \cdot 10^{-7}$
Cu (Lig I) (1:1)	$3 \cdot 10^{-7}$
Cu (Lig II) (1:1)	10^{-6}
$ZnSO_4$	$1{,}5 \cdot 10^{-5}$
Zn-ac	$1{,}5 \cdot 10^{-5}$
Zn-Cys (1:2)	$2{,}3 \cdot 10^{-5}$
Zn (Lig II) (1:1)	$8 \cdot 10^{-4}$
Zn-ÄDTA (1:1)	$2{,}3 \cdot 10^{-3}$

Bei Versuchen mit organischen Komplexsalzen spielen ausser der spezifischen Hemmwirkung des Metalles auch andere Faktoren eine Rolle, wie die Stabilität des eingesetzten Komplexes, sein sterischer Aufbau und die Art der gebildeten Chelate. Am Beispiel der verwendeten Komplexe des Kupfers und des Zinks ist die Wechselwirkung verschiedener Einflüsse zu sehen. Kupfer und Zink bilden mit dem Liganden II die bekannt stabilen 5-Ring-Chelate. Diese hemmen infolgedessen wesentlich schwächer als eine entsprechende Salzlösung des betreffenden Metalles. Die Hemmintensität ist um etwa eine halbe Zehnerpotenz nach unten verschoben.

Anders liegen die Verhältnisse bei Ligand I. Ihre Kupfer- und Zinkkomplexe hemmen gleich stark wie vergleichbare Konzentrationen von Kupfer- oder Zinksulfat. Hier wäre auf Grund der Konstitution denkbar, dass gemischte Komplexe Enzym-Metall-Ligand, gebildet würden. Für den Zink-Cystein 1:2-Komplex ist eine entsprechende Deutung möglich. Er kann mit dem Ferment reagieren indem er nur einen Liganden gegen -SH austauscht; es bildet sich dann ein Komplex Cystein-Inhibitor-S-Protein.

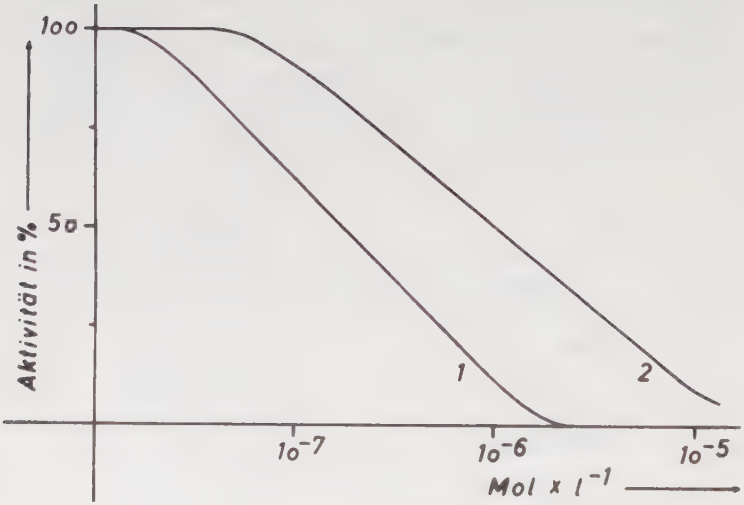


Abb.4. Einfluss des metallbildenden Liganden auf die Schwermetallhemmung von α-GDH.
Kurve I = Cu- (Lig I), Kurve 2 = Cu- (Lig II).
Reaktionsbedingungen wie bei Abb.1 angegeben.

3. Reaktivierungsversuche des metallgehemmten Enzyms

Das Ferment wurde mit Schwermetallen, in Konzentrationen, die eine Verminderung der Aktivität um 50 % bewirken, eine halbe Minute vorinkubiert. Darauf folgte die Zugabe des zu prüfenden Reaktivators und nach einer weiteren halben Minute wurde die Reaktion mit Coenzym und Substrat gestartet.

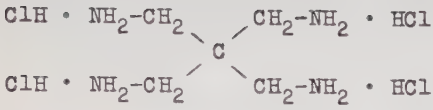
Folgende Substanzen wurden getestet:

Cystein, ÄDTA

$$\begin{matrix} ClH \cdot H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2 \\ \\ ClH \cdot H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2 \end{matrix} \diagdown \; N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N \; \diagup \begin{matrix} CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2 \cdot HCl \\ \\ CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2 \cdot HCl \end{matrix}$$

= Ligand III

N,N,N',N'-Tetra-kis-amino-äthyläthylen-diamin



= Ligand IV

Tetra-amino-tetramethyl-methan · 4 HCl

Die durch PCMB hervorgerufene Hemmung ist durch Cystein wieder rückgängig zu machen, da nur durch dessen SH-Gruppen Quecksilber gebunden und so vom Enzym entfernt werden kann. Alle anderen Reaktivatoren aus der Gruppe der Chelatbildner sind aus sterischen Gründen ungeeignet. Bei der Reaktivierung mit Cystein ist zu beachten, dass es den Aktivitätsabfall, den das Enzym bei längerem Stehen an der Luft erleidet, wieder rückgängig machen kann. Thiolgruppen, die durch Einwirkung von Luftsauerstoff S-S-Bindungen bilden, werden durch Cystein wieder zurückreduziert. Da diese Eigenschaft des Cysteins erst nach längerer Zeit voll zur Auswirkung kommt[9], wurde die Reaktivierungszeit auf eine halbe Minute beschränkt.

Um die 50-proz. Hemmung des Enzyms mit PCMB rückgängig zu machen war ein hundertfacher Überschuss an Cystein nötig; auch die völlige Hemmung kann durch Cystein wieder aufgehoben werden. Das ungehemmte Enzym wird innerhalb eines Zeitraumes von bis zu 5 Minuten durch Cystein nicht aktiviert.

Aus Tabelle 4 sind die Konzentrationen der Reaktivatoren ersichtlich, die eine durch Kupfer, Zink oder Kobalt gesetzte Hemmung aufheben können. Es fällt auf, dass Cystein in der Reihe von PCMB zum Kobalt in immer geringeren Konzentrationen zugesetzt werden muss. Während bei PCMB und Kupfer noch der hundertfache Überschuss nötig war, um die Aktivität wieder völlig auf den Anfangswert zu bringen, sinkt das Verhältnis Hemmstoff - Cystein beim Zink auf 1:8 und beim Kobalt auf 1:3.

Tabelle 4. Reaktivierung der zu 50 % metallgehemmten α-GDH

Standardansatz in folgender Reihenfolge:
TRA, Inhibitor, α-GDA 1/2 min Vorinkubation,
Reaktivator, 1/2 min Reaktivierungszeit,
Start durch die DOAP und DPNH.
Alle Reaktivatoren in 1/20 m TRA pH 7,6 gelöst, 25°C.

Hemmstoff	Konz.	Völlige Reaktivierung durch: ÄDTA	Cystein	Ligand III	Ligand IV
PCMB	$1{,}1 \cdot 10^{-7}$	-	10^{-5}	-	-
Cu	$4{,}5 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$8{,}5 \cdot 10^{-6}$	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$
Zn	$1{,}5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1{,}2 \cdot 10^{-4}$	$1{,}9 \cdot 10^{-5}$	$4{,}9 \cdot 10^{-4}$
Co	$4{,}5 \cdot 10^{-4}$	$4{,}5 \cdot 10^{-4}$	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$	-	-

Wesentlich geringere Unterschiede herrschen bei der Reaktivierung mit ÄDTA. Es muss nur im Verhältnis 1:1 bei Zink und Kobalt und im Verhältnis 1:20 beim Kupfer zugegeben werden.

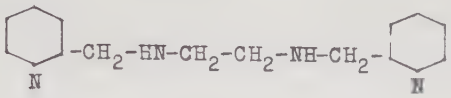
Gleich wirksam bei der Aufhebung der Zinkhemmung ist N,N,N',N'— Tetra-kis-β-amino-äthyläthylen-diamin. Auch diese Substanz reaktivierte im Verhältnis 1:1 zum Zink. Die Kupferhemmung wurde von dem Liganden III ebenfalls im gleichen Verhältnis wie vom ÄDTA reaktiviert.

Die Arbeitskreise um BÜCHER[31)] und VAN EYS[33)] stellten schon früher fest, dass die α-GDH durch ÄDTA in besonders hohem Masse aktiviert wird. In dieser aktivierenden Eigenschaft wurde ÄDTA von keiner anderen untersuchten Substanz erreicht. In dem Liganden III fanden wir eine, dem ÄDTA ähnliche Verbindung, die in ihrer aktivierenden und reaktivierenden Wirkung dem ÄDTA mindestens gleichwertig ist.

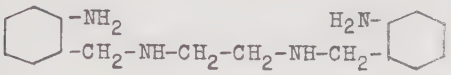
Die Struktur dieses Stoffes lässt vermuten, dass wir beim ÄDTA mit Schwermetallen 1:1 Komplexe gebildet werden, die in ihrer Stabilität den 1:1 Komplexen des ÄDTA mindestens gleich sind+)

+) Stabilitätsbestimmungen noch nicht durchgeführt.

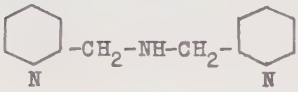
Um die mit Ligand III erzielten Ergebnisse zu bestätigen wurden weitere, strukturell ähnliche Verbindungen im Reaktivierungstest eingesetzt. Es waren dies folgende Substanzen:



N,N'-Bis-(2-picolyl)-äthylendiamin = Ligand V



N,N'-Bis-(o-aminobenzyl)-äthylendiamin = Ligand VI



Bis-(2-picolyl)-amin = Ligand VII

Erwartungsgemäss zeigte sich, dass der Ligand V den stärksten Reaktivierungseffekt hat. Auch in seinen aktivierenden Eigenschaften ist es ÄDTA und dem Liganden III völlig gleichwertig.

Um eine 50-proz. Zinkhemmung wieder aufzuheben muss von Ligand VI der 6,5-fache und von Ligand VII der 3 1/2-fache Überschuss eingesetzt werden.

Der verschieden hohe Grad der Reaktivierung des metallgehemmten Fermentes durch die angewandten Verbindungen kann durch deren unterschiedliche Struktur erklärt werden. Ligand V reaktivierte die proteinogenen SH-Gruppen am stärksten, da er ausschliesslich stabile 5-Ring-Chelate bildet. Dieselbe Eigenschaft sollte man von Ligand VII erwarten. Auch hier sind ausschliesslich 5-Ring-Chelate möglich. Im Gegensatz zu Ligand V ist er jedoch nur in der Lage dem Schwermetall drei Koordinationsstellen zur Verfügung zu stellen. Infolgedessen ist hier der 1:1 Komplex gegenüber dem 1:2 Komplex benachteiligt. Das

Ergebnis des Reaktivierungsversuchs befindet sich mit dieser Betrachtungsweise in guter Übereinstimmung. Das Verhältnis 1:1 reicht nicht aus das zinkgehemmte Enzym zu reaktivieren. Ligand V dagegen stellt dem Metall vier Koordinationsstellen zur Verfügung und bildet einen starken 1:1 Komplex[50].

Umgekehrt wie bei Ligand VII liegen die Verhältnisse bei Ligand VI. Er ist zwar in der Lage vier Koordinationsstellen anzubieten und einen 1:1 Komplex zu bilden[50], aus der Struktur ergibt sich jedoch, dass hier nur ein fünfgliedriger Chelatring und zwei sechsgliedrige Chelatringe möglich sind. Dementsprechend wird das schwächere Reaktivierungsverhalten von 1:6,5 gefunden. Das Ergebnis steht mit dem schwächeren Komplexbildungsvermögen von Chelat-6-Ringen in Übereinstimmung und bestätigt die mit Ligand IV erzielten Ergebnisse.

4. Bestimmung des Hemmtyps

Die Versuche zur Bestimmung des Hemmtyps wurden nach der Methode von LINEWEAVER und BURK[42] durchgeführt.

Die Abbildung 6 zeigt die Geraden, welche entstehen wenn der reziproke Wert der Reaktionsgeschwindigkeit gegen den reziproken Wert der Substratkonzentration aufgetragen wird. Die Enzymaktivität wird in einer Messreihe bei steigenden Substratkonzentrationen verfolgt, in einer zweiten kommt zum gleichen Reaktionsansatz noch eine gleichbleibende Menge Metallinhibitor hinzu.

Aus dem Verlauf der Geraden ist ersichtlich, dass die Schwermetallhemmung der a-GDH nach dem Typus der kompetitiven Hemmung verläuft.

Die kompetitive- oder Verdrängungshemmung ist dadurch charakterisiert, dass Inhibitor und Substrat um die substratbindende Gruppe des Enzyms konkurrieren. Die Michaeliskonstante wird scheinbar erhöht aber die Maximalgeschwindigkeit bleibt unverändert. Das relative Ausmass der Hemmung hängt vom Verhältnis der Inhibitorkonzentration zur Substratkonzentration ab.

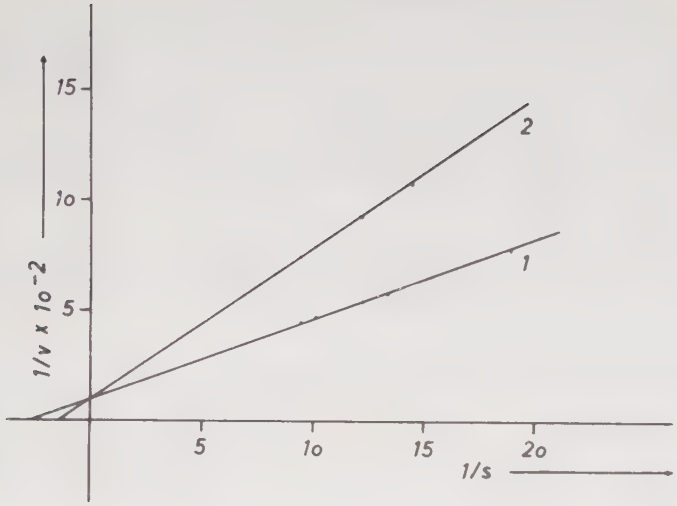


Abb.5. Bestimmung des Hemmungstyps von Schwermetallen mit α-GDH.
Der Reaktionsansatz enthält: 2,6 ml TRA-Puffer m/20, pH 7,6; 0,015 ml DOAP (variiert von $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-4}$ m); 0,015 ml DPNH, $2 \cdot 10^{-5}$ m; 0,1-0,3 ml H_2O quarzdestilliert und 0,1 ml Inhibitorlösung $3{,}3 \cdot 10^{-5}$ m, beide zusammen immer 0,3 ml.
Messung am Photometer Eppendorf. Gemessen wurde die Zeit der Extinktionsänderung um 0,05 nachdem 0,02 Extinktionseinheiten durchlaufen waren.
Kurve 1 = mit Inhibitor, Kurve 2 = ohne Inhibitor.

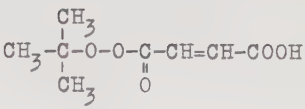
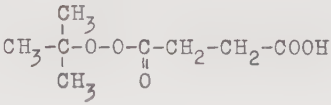
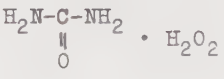
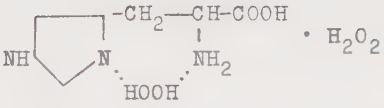
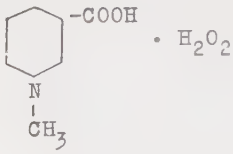
II. 1. Hemmung durch organische Peroxyde

Es ist bekannt, dass die meisten Glykolysefermente gegenüber organisch gebundenem Persauerstoff hochempfindlich sind. Das wurde für GAPDH[9], Aldolase[9], Hexokinase[14)15)] und LDH[14] nachgewiesen und gilt wahrscheinlich für alle SH-Gruppenfermente. Auch im Tierversuch wurde diese starke Wirksamkeit beobachtet[12].

Angaben über die Einwirkung organischer Persauerstoffverbindungen auf die α-GDH sind in der Literatur nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit werden Versuche mit solchen Substanzen beschrieben.

Folgende wasserlösliche Verbindungen wurden eingesetzt:

Hemmstoff	Struktur
a) Alkylhydroperoxyde:	
n-Butyl-hydroperoxyd	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-O-OH$
t-Butyl-hydroperoxyd	$CH_3-\overset{\overset{CH_3}{\vert}}{\underset{\underset{CH_3}{\vert}}{C}}-O-OH$
α-Hydroxyäthyl-hydroperoxyd	$CH_3-CHOH-O-OH$
b) Bis-Hydroxymethyl-peroxyd und Derivate:	
Bis-Hydroxymethyl-peroxyd	$HO-CH_2-O-O-CH_2-OH$
Hydroxymethyl-t-butyl-peroxyd	$CH_3-\overset{\overset{CH_3}{\vert}}{\underset{\underset{CH_3}{\vert}}{C}}-O-O-CH_2-OH$
Hydroxymethyl-n-butyl-peroxyd	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-O-O-CH_2-OH$
n-Butyl-peroxymethyl-piperidin	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-O-O-CH_2-N$
Dimethyl-piperidyl-peroxyd	$N-CH_2-O-O-CH_2-N$

Hemmstoff	Struktur
c) Acylperoxyde:	
saures, t-Butyl-malein-peroxyd	
saures, t-Butyl-succin-peroxyd	
d) Organische Peroxohydrate:	
Carbamid-peroxohydrat	
L-Histidin-peroxohydrat	
Trigonellin-peroxohydrat	

Die Enzymaktivität wurde im Photometer Eppendorf bei 366 mμ gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Hemmung in % ad 100 % = Restaktivität.

Tabelle 5. Hemmung der α-GDH mit organischen Peroxydverbindungen

Versuchsanordnung: TRA-Puffer m/20, pH 7,6; Peroxyd gelöst in TRA pH 7,6; 15 min Inkubationszeit; Start DPNH $2 \cdot 10^{-4}$ m + DOAP $2{,}7 \cdot 10^{-4}$ m; 25°C; Endvolumen 3 ml.

Hemmstoff	mol.Endkonz.	Hemmung in %
n-Butyl-hydroperoxyd	10^{-3}	57
t-Butyl-hydroperoxyd	10^{-3}	33
α-Hydroxyäthyl-hydroperoxyd	$5 \cdot 10^{-3}$	68
	10^{-3}	55
	$3 \cdot 10^{-4}$	43
Bis-Hydroxymethyl-peroxyd	10^{-3}	43
	$5 \cdot 10^{-5}$	15
Hydroxymethyl-t-butyl-peroxyd	10^{-3}	0
Hydroxymethyl-n-butyl-peroxyd	10^{-3}	18
n-Butyl-peroxymethyl-piperidin	10^{-3}	50
t-Butyl-peroxymethyl-piperidin	10^{-3}	32
Bis-Piperidinomethyl-peroxyd	10^{-3}	64
saures-t-Butyl-succino-peroxyd	$5 \cdot 10^{-3}$	30
	10^{-3}	17
saures-t-Butyl-malein-peroxyd	10^{-3}	16
Carbamid-peroxohydrat	10^{-3}	40
Trigonellin-peroxyhydrat	10^{-3}	32
L-Histidin-peroxohadrat	10^{-3}	27

In orientierenden Vorversuchen wurde festgestellt, dass das Ausmass der Hemmeffekte zeitabhängig ist. Besonders deutlich zeigt sich das am Beispiel des α-Hydroxyäthyl-hydroperoxyd. Diese Persauerstoffverbindung hemmt die α-GDH nach einer Vorinkubationszeit von 5 Minuten nur knapp über 25 % ; wird die Einwirkung des Inhibitors auf 15 Minuten verlängert hat das eine Verdoppelung der Hemmung zur Folge.

Ähnliche Verhältnisse herrschen bei den drei eingesetzten Peroxohydraten und schwächer bei Bis-Hydroxymethyl-peroxyd. Bei den restlichen Verbindungen war dieser Effekt wesentlich schwächer ausgeprägt. Wählt man schliesslich Vorinkubationszeiten von 30 Minuten oder einer Stunde so steigert sich die Hemmwirkung nur noch um etwa 10 %. Es konnte also eine Vorinkubation des Peroxydinhibitors auf das Protein von 15 Minuten als voll ausreichend und charakteristisch angesehen werden.

Die eingesetzten Peroxyd-Hemmstoffe können in vier Gruppen unterteilt werden, nämlich in Alkyl-hydroperoxyde, Bis-Hydroxymethyl-peroxyd und dessen Derivate, Acylperoxyde und organische Peroxohydrate.

Aus Tabelle 5 geht deutlich hervor, dass die einzelnen Gruppen unterschiedliche Hemmintensität besitzen. Diese Unterschiede lassen Schlüsse darauf zu, ob zwischen bestimmten Strukturelementen und den Aktivitätsverlusten der α-GDH ein Zusammenhang besteht. Dies sei im Folgenden erörtert.

In der Reihenfolge der Tabelle 5 stehen am Ende die Peroxohydrate, Verbindungen, die den wirksamen Persauerstoff koordinativ gebunden enthalten. Ihre Wirksamkeit schwächt sich vom Carbamid- zum Histidinperoxyhydrat deutlich ab. Den stärksten Hemmeffekt zeigt das Carbamidperoxyhydrat. In Konzentrationen von 10^{-3}m verliert die α-GDH 40 % ihrer Aktivität. Auch das Trigonellinperoxyhydrat beeinflusst die α-GDH noch ziemlich stark, während die entsprechende Histidinverbindung stark abfällt. Der gleiche Effekt wurde auch schon bei der Einwirkung dieser Substanzen auf Ascites Krebszellen beobachtet[11]. Er zeigt, dass Struktur und Wirkung in diesem Fall voneinander abhängig sind.

In der Gruppe der organischen Peroxyde erwiesen sich die Alkyl- besonders aber die stickstofftragenden Dialkyl-Peroxyde

als die stärksten α-GDH-Inhibitoren. n-Butyl-hydroperoxyd hemmt selbst in Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-4}$m noch deutlich, von 10^{-3}m zu 57 %. Seine Hemmintensität ist also durchaus mit der von Metallsalzlösungen vergleichbar. Der Austausch von n-Butyl gegen t-Butyl bedeutet eine starke Abschwächung der Wirkung. Der α-Hydroxyäthylrest ist dem n-Butylrest fast gleichwertig.

In der Gruppe des Bis-Hydroxymethyl-peroxyds zeigt sich der Einfluss der Strukturvariationen am klarsten. Die Grundsubstanz Bis-Hydroxymethyl-peroxyd bewirkt eine Hemmung von 43 % und liegt in ihrem Hemmvermögen etwa bei den Peroxyhydraten. Bei Einführung des n-Butylrestes schwächt sich die Wirkung um mehr als die Hälfte ab, um dann bei der t-Butyl-hydroxymethyl-peroxydverbindung ganz zu verschwinden.

Der gegenteilige Effekt, eine erhebliche Wirkungssteigerung, wird mit der Einführung der Piperidylreste erreicht. Die beiderseits piperidinsubstituierte Bis-Hydroxymethyl-peroxydverbindung erreichte schliesslich die stärkste Abnahme der Fermentaktivität aller untersuchter Peroxyde. Wiederum wirken sowohl n-Butyl- als auch der t-Butylrest abschwächend.

Nur sehr schwach wirksam waren die Substanzen der Acylperoxydgruppe. Beide eingesetzten Stoffe, das t-Butyl-succinperoxyd und das t-Butyl-maleinperoxyd bewirkten eine Hemmung von nur 16-17 %.

Eine durchgehende Erscheinung bei sämtlichen untersuchten Peroxyden war die auffallende Parallelität zwischen Hemmung und den Ergebnissen des Thiazolidintestes, wie er von WEITZEL und Mitarbeitern[12)] beschrieben wurde. Diese Methodik kann zur Bestimmung der Reaktionsfähigkeit organischer Peroxyde verwendet werden. Testet man die hier angeführten Verbindungen mit dieser Versuchsanordnung so zeigt sich, dass die Geschwindigkeit der Freigabe des aktiven Sauerstoffes und die Hemmintensität parallel verlaufen.

Bei Substanzen wie Hydroxymethyl-n-butyl-peroxyd oder dem t-Butyl-Analogen, die kaum eine Aktivitätsverminderung bewirken, konnte auch im Thiazolidincarbonsäuretest kaum eine Abnahme des aktiven Sauerstoffs nachgewiesen werden. Das Gegenteil ist beim n-Butyl-hydroperoxyd zu beobachten. Seiner starken Hemmwirkung entspricht im Thiazolidintest eine Abnahme des Sauerstoffs um 22 % schon nach 5 Minuten.

2. Reaktivierung des peroxydgehemmten Enzyms

Da unter der echten Hemmung eines Enzyms nur die reversible Veränderung der Fermentaktivität zu verstehen ist, wurde versucht auch das peroxydgehemmte Enzym zu reaktivieren. Als Reaktivierungsmittel wurde Cystein gewählt. Es lag als Hydrochlorid vor, wurde mit einer annähernd äquivalenten Menge Natronlauge neutralisiert und mit TRA-Puffer m/20 pH 7,6 aufgefüllt. Die Lösung wurde zu jeder Versuchsreihe frisch hergestellt. Wie schon bei der Schwermetallhemmung beschrieben, wird die α-GDH von Cystein alleine nicht aktiviert. Bleibt der Reaktionsansatz allerdings über eine Stunde stehen, so tritt eine Aktivitätsverminderung ein, die durch Cystein rückgängig gemacht werden kann. Bei Inkubationszeiten von über einer Stunde könnte dieser Effekt eine Abnahme der Peroxydhemmung vortäuschen. Es wurde deshalb der Versuch so angelegt, dass sowohl die Einwirkung des Inhibitors, wie die des Reaktivators jeweils 15 Minuten dauerte und so Verfälschungen der Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten.

Es ergab sich, dass die Hemmung der α-GDH durch die eingesetzten Peroxydverbindungen in jedem Fall durch den Reaktivator weitgehend aufgehoben werden kann. Es ist dazu immer ein mehr oder weniger grosser Überschuss an Cystein nötig. Werden die Konzentrationen der Inhibitoren so gewählt, dass 50-proz. Hemmung eintritt, so wächst die Schwierigkeit sie rückgängig zu machen in der Reihe von den Peroxydhydratverbindungen über Bis-Hydroxymethyl-peroxyd und dessen Derivate zu den Dialkylperoxyden. Die einzelnen Verbindungen jeder Gruppe zeigen kaum Unterschiede. Die Hemmung durch die H_2C_2-Assoziate kann mit dem zwanzigfachen Überschuss an Cystein fast völlig aufgehoben werden; für die Gruppe der Bis-Hydroxymethyl-peroxyde ist dazu schon ein fünfundzwanzig- bis dreissigfacher Überschuss nötig. In der letzten Gruppe muss dann nochmals auf den fünfunddreissigfachen Überschuss gesteigert werden.

Die Aktivität der α-GDH kann zwar sehr weitgehend wieder hergestellt werden, es bleibt jedoch im Gegensatz zur Schwermetallhemmung immer ein kleiner Rest von etwa 15 % irreversibler Hemmung.

3. Bestimmung des Hemmtyps

Die Untersuchung des Hemmungstyps der Peroxydverbindungen auf die α-GDH erfolgte wie bei der Schwermetallhemmung ebenfalls nach LINEWEAVER und BURK[42]. Die Abbildung 7 zeigt, dass die Peroxyd- wie die Schwermetallhemmung dem Typ der kompetitiven Hemmung entspricht.

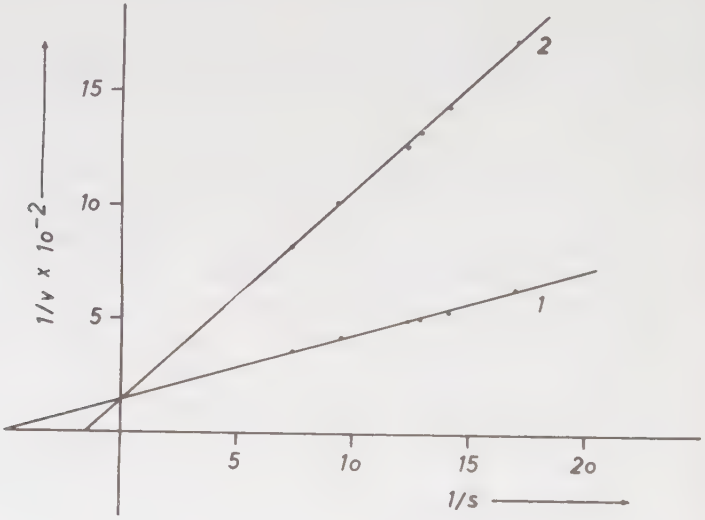


Abb.6. Bestimmung des Hemmungstyps organischer Peroxyde mit α-GDH.

Der Reaktionsansatz enthält: 2,6 ml TRA-Puffer m/20, pH 7,6; 0,015 ml DOAP (variiert von 10^{-4}m bis $5 \cdot 10^{-4}$m); 0,015 ml DPNH $2 \cdot 10^{-5}$m; 0,1-0,3 ml H_2O quarzdestilliert und 0,1 ml Inhibitorlösung $2 \cdot 10^{-3}$m, beide zusammen immer 0,3 ml . Messungen am Eppendorf Photometer. Gemessen wurde die Zeit der Extinktionsänderung um 0,05 nachdem 0,02 Extinktionseinheiten durchlaufen waren. Kurve 1 = mit Inhibitor; Kurve 2 = ohne Inhibitor.

III. Hemmung durch alkylierende Substanzen

Nach den Versuchen mit verschiedenen Schwermetallen und organischen Peroxydverbindungen wurde das Verhalten der α-GDH gegenüber alkylierenden Verbindungen untersucht.

Es wurden folgende Verbindungen eingesetzt:
Jodacetat, Jodacetamid, Maleinimid, N-Äthylmaleinimid, N-Carbamylmaleinsäure, N-Carbamylmaleinimid, Stickstofflost.

Sie können in drei Gruppen zusammengefasst werden:

1. jodierte Essigsäuren
2. Derivate der Maleinsäure
3. N-Lost

Die Wirkungsweise der halogenierten Essigsäuren stellt man sich heute so vor, dass unter dem Einfluss der benachbarten Carbonylgruppe eine Elektronenverschiebung erfolgt und das Halogenatom positiv aufgeladen wird. Dadurch wird seine Reaktionsfähigkeit mit den SH-Gruppen des Enzyms erhöht.

Die gleichen Gruppierungen, die bei der Halogenessigsäure die Elektronenverschiebung bewirken, haben bei den Derivaten der Maleinsäure eine Polarisation der Doppelbindung zur Folge. Beim Stickstofflost übernimmt das Stickstoffatom die aktivierende Rolle.

Alle diese Verbindungen reagieren nicht unbedingt spezifisch mit SH-Gruppen wie dies beim PCMB der Fall ist. Es ist bekannt, dass Jodacetat auch leicht mit Aminogruppen[51], oder mit Histidin- oder Tyrosinresten der Proteine reagieren kann. Es zeigt geringe Aktivität mit maskierten SH-Gruppen. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim N-Äthylmaleinimid. Zwar gilt es als relativ spezifischer SH-Gruppenhemmstoff indem es stabile Thioäther bildet, aber es zeigt ebenfalls nur selten Wirkung an maskierten Thiolgruppen.

Die Hemmstoffe wurden in quarzdestilliertem Wasser gelöst und am pH-Messgerät genau auf pH 7,6 eingestellt.

Die Inkubationszeiten wurden auf bis zu zwei Stunden ausgedehnt, wobei die 1:10 verdünnte Enzymsuspension in der TRA-Pufferlösung, pH 7,6, mit dem jeweiligen Inhibitor angesetzt

wurde. Zur Messung der verbliebenen Enzymaktivität erfolgte der Start der Reaktion mit DPNH und DOAP gemeinsam.

Das Ergebnis dieser Versuche war sehr überraschend: Keine der oben angeführten alkylierenden Substanzen vermochte innerhalb sinnvoller Konzentrationen die Aktivität der α-GDH zu hemmen. Dabei wurden die Inhibitorlösungen in Konzentrationen bis zu 10^{-3}m zugesetzt und deren Einwirkung auf das Enzym bis zu zwei Stunden ausgedehnt, ohne dass eine Verminderung der Aktivität zu erkennen war. Wurden die N-Äthylmaleinimidkonzentrationen auf über 10^{-3}m erhöht, was bei einer eingesetzten Enzymmenge von etwa $2 \cdot 10^{-7}$m, einem 50 000-fachen Überschuss entspricht, so konnte schon nach fünf Minuten eine Abschwächung der Aktivität beobachtet werden. Dieser Effekt dürfte aber kaum mehr einer echten Hemmung entsprechen, sondern eher die Folge einer Eiweissdenaturierung sein. Bei geeignet gewählten Reaktionsansätzen, bei denen die Enzymkonzentration erhöht wurde, konnte nach Zugabe von N-Äthylmaleinimid 10^{-2}m mit blossem Auge deutliche Niederschläge von denaturiertem Eiweiss erkannt werden.

Zur Sicherung des Befundes, dass mit alkylierenden Verbindungen keine Hemmung der α-GDH erzielt werden konnte, wurde untersucht, ob andere Komponenten des Reaktionsansatzes eventuell in störender Weise eingreifen und das Ergebnis verfälschen.

Die ziemlich unwahrscheinliche Möglichkeit, dass eines der Alkylierungsmittel mit dem TRA-Puffer reagieren konnte wurde durch Verwendung anderer Puffer ausgeschlossen. Auch in Tris- und in Pyrophoyphatpuffer, pH 7,6 konnte keine Hemmung festgestellt werden.

Wie schon bei den Schwermetallversuchen angeführt wurde wäre es auch hier nicht ausgeschlossen, dass Coenzym oder Substrat den Hemmstoff abfangen. Durch Reaktion von DPNH oder DOAP oder beider Substanzen gemeinsam konnte dem Ansatz eine mehr oder weniger grosse Menge Inhibitor entzogen werden. Wenn man voraussetzt, dass die Reaktion bei optimalen Verhältnissen gestartet wird, so befindet sich sowohl Coenzym als auch Substrat im Überschuss. Es wäre also möglich, dass

entweder beide oder auch nur eine dieser Komponenten mit dem jeweiligen Alkylierungsmittel reagieren, der Hemmstoff damit abgefangen würde, und trotzdem noch genügend Coenzym und Substrat vorhanden ist um die Reaktion unverändert ablaufen zu lassen.

Diesem Einwand widersprechen allerdings schon die Konzentrationsverhältnisse. Coenzym und Substrat werden beide $2 \cdot 10^{-4}$m eingesetzt; die Inhibitorkonzentration war also bis zu fünfhundert mal höher. Ein vollständiges Abfangen solcher Konzentrationen ist kaum denkbar ohne die Reaktionsgeschwindigkeit zu verringern.

Setzt man die Coenzym- und Substratkonzentration soweit herab, dass die Reaktion gerade noch geradlinig verläuft und gibt dann den Hemmstoff zu, so bleibt die Geschwindigkeit ebenfalls unverändert.

Bei einer Reaktion zwischen DPNH und Alkylierungsmittel müsste die Extinktion von DPNH bei 366 mμ absinken. Es wurde deshalb nach jedem Pipettierschritt die Extinktion bei 366 mμ verfolgt, so dass ein fortschreitendes Abfallen oder Anwachsen der Extinktion hätte auffallen müssen. Auch dieser Einwand liess sich nicht bestätigen.

Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass Coenzym und Substrat erst zum Start zugegeben werden, also nur für den Zeitraum von wenigen Sekunden im Ansatz wirksam sind, während die alkylierenden Inhibitoren bedeutend länger einwirken konnten.

N-Äthylmaleinimid, das als eines der am stärksten wirksamen Alkylierungsmittel angesehen werden kann[52], und deshalb sogar zur Titration proteinogener SH-Gruppen geeignet ist[52)53], wurde zu weiteren Versuchen herangezogen.

Nach ROBERTS und ROUSER[52] zeigt das Spektrum von N-Äthylmaleinimid bei 300 mμ ein stark ausgeprägtes Maximum. Reagiert es an seiner Doppelbindung mit einem anderen Stoff, der in diesem Wellenbereich selbst nicht absorbiert, so muss dies als Extinktionsänderung in Erscheinung treten. Eine 10^{-3}m N-Äthylmaleinimidlösung, pH 7,6, wurde also einmal mit Enzym, dann mit DPNH und schliesslich mit DOAP angesetzt und das

Spektrum des N-Äthylmaleinimid alle fünf Minuten am registrierenden Spektralphotometer aufgezeichnet. Werden die entstehenden Kurven um jenen Faktor korrigiert, der der Hydrolyse der N-Äthylmaleinimid-Doppelbindung entspricht[53], so ist kein Absinken der Extinktion bei 300 mμ zu beobachten.

Schliesslich wurden alle eingesetzten Alkylierungsmittel in ihrer Wirkung auf ein anderes SH-Enzym getestet. Zu diesen Versuchen wurde Alkoholdehydrogenase aus Leber gewählt, die Abbildung 7 zeigt als Beispiele die Einwirkung identischer Lösungen von N-Äthylmaleinimid, Jodacetamid, N-Carbamyl-maleinsäure auf ADH und daneben auf α-GDH.

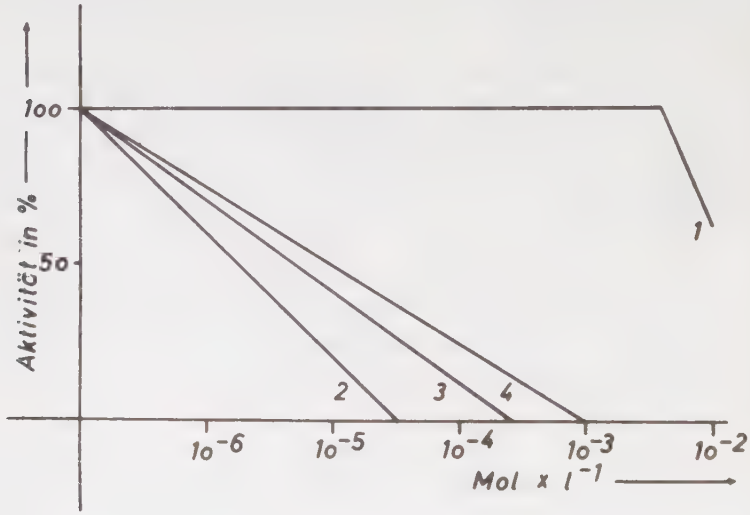


Abb. 7. Einwirkung von N-Äthylmaleinimid, Jodacetamid und N-Carbamyl-maleinsäure auf ADH und auf GDH.

Kurve 1 = GDH + Inhibitoren
Kurve 2 = ADH + N-Äthylmaleinimid
Kurve 3 = ADH + N-Carbamyl-maleinsäure
Kurve 4 = ADH + Jodacetamid

Aus Abbildung 7 ist zu ersehen, dass mit Konzentrationen an Inhibitor, die die ADH völlig inaktivieren, α-GDH nicht die geringste Veränderung der Aktivität zeigt.

Alle durchgeführten Versuche ergaben also, dass die α-GDH bei den gegebenen Verhältnissen durch alkylierende Substanzen nicht zu hemmen ist. Dieser Effekt wäre durch die Annahme erklärbar, dass die SH-Gruppen dieses Fermentes bei einem pH-Wert von 7,6 in maskierter Form vorliegen.

Die Ergebnisse von VAN EYS[31] mit Jodacetat und N-Äthylmaleinimid stehen dazu nicht unbedingt im Widerspruch, wenn man die Unterschiede beider Versuchsanordnungen berücksichtigt. VAN EYS und Mitarbeiter bekamen mit N-Äthylmaleinimid 10^{-4}m völlige Inaktivierung und mit der gleichen Konzentration Jodacetat 23-proz. Hemmung. Die amerikanischen Autoren stellten ihre Versuche zwar ebenfalls an der α-GDH an, untersuchten aber die Aktivität des Enzyms bei der Rückreaktion, der Oxydation von Glycerin-phosphat zu DOAP. Das Baranowski-Enzym hat nach YOUNG und PACE[35] für beide Reaktionsrichtungen verschiedene pH-Maxima. Der höchste Umsatz von Dioxyacetonphosphat zu Glycerin-phosphat findet bei einem pH-Wert von etwa 7,5 statt, während die umgekehrte Reaktion ihr Maximum bei pH 10,2 erreicht. VAN EYS und Mitarbeiter messen deshalb in Tris-Puffer bei pH 9,5 .

Es könnte sehr wohl sein, dass die SH-Gruppen, die bei pH 7,6 noch in maskierter Form vorliegen bei stärker alkalischer Reaktion Veränderungen erleiden, die einen Angriff alkylierender Verbindungen auf die Thiolgruppen des Fermentes eher erlauben.

GREGORY[53] fand, dass Myokinase bei pH 7,5 von N-Äthylmaleinimid $2 \cdot 10^{-4}$m erst nach 30 Minuten zu 95 % inaktiviert wurde, dass aber die wesentlich geringere Konzentration desselben Stoffes von $5 \cdot 10^{-5}$m bei pH 9,0 in 5 Minuten das gleiche Resultat zeigte.

In einer Arbeit von PFLEIDERER, JECKEL und WIELAND [55] über die Milchsäuredehydrogenase wurde festgestellt, dass weder Jodacetamid noch N-Äthylmaleinimid die maskierten SH-Gruppen des Fermentes anzugreifen vermögen und dass die Enzymaktivität nicht verringert wird.

Bei Versuchen mit dem „Fettpilz" Endomycopsis vernalis, in dessen Stoffwechsel der α-GDH besondere Bedeutung zukommt, konnte BRUCHMANN[28] zeigen, dass ein Enzymextrakt aus aktivem Oberflächenmycel zwar durch PCMB leicht hemmbar, gegen Jodacetat aber unempfindlich ist.

Auf Grund der genannten Befunde erscheint es möglich, dass die Thiolgruppen der α-GDH in schwach alkalischem Milieu vor dem Angriff alkylierender Reagenzien geschützt sind.

IV. Tierexperimenteller Teil

Substanzen und Methodik

Albinoratten eines Stammes, gleichen Gewichts (200 g) Alters und Geschlechts, wurden durch intraperitoneale Injektionen geeigneter Stoffe behandelt. Diese wurden aus den bisher verwendeten Inhibitoren ausgewählt.

Aus der Gruppe der Schwermetalle bot sich wegen seiner geringen Giftigkeit das Zink an. Es wurde in Form eines Zink-Glycin 1:2-Komplexes eingesetzt. Auch Kupferkomplexverbindungen waren für die relativ kurze Versuchsdauer gut verträglich. Die Tiere überlebten trotz teilweise recht hoher Konzentrationen sogar Injektionen von PCMB.

Von den bisher verwendeten organischen Peroxyden wurden drei Substanzen ausgewählt, die sich durch hohe in vitro-Wirksamkeit ausgezeichnet hatten. Es handelt sich um das α-Hydroxyäthyl-peroxyd; Bis-Hydroxymethyl-peroxyd und das Bis-Piperidinomethyl-peroxyd.

Für die Versuche mit alkylierenden Substanzen wurden Jodacetamid, N-Äthylmaleinimid und Äthylenimin (Farbwerke Höchst) herangezogen.

In variierten Zeitabständen nach der intraperitonealen Injektion wurden die Tiere durch Dekapitieren getötet. Danach wurde sofort die Leber entnommen und aus dem [illegible] lateralis ein Sektor von etwa 400 mg herausgeschnitten. Er wurde auf einer Haltbarkeitswaage gewogen und dann anschliessend im vorgekühlten Potter 3 Minuten homogenisiert. Der Homogenisator war durch ein Eisbad gekühlt; die Raumtemperatur betrug + 2°C. Die Extraktion der Enzyme erfolgte mit physiologischer Kochsalzlösung; (0,9 ml pro Milligramm Leber feuchtgewicht)[56]. Zwei Drittel der Flüssigkeitsmenge wurden zur Homogenisation zugegeben und mit dem restlichen Drittel der Homogenisator nachgespült. Zusammen wurden sie daraufhin 25 Minuten bei 0°C und 20 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Tabelle 6. Beziehung zwischen Homogenisierungszeit und messbarer Enzymaktivität

Zeit in Min.	Enzymaktivität in µ M/ml/h
1	19,34
2	22,9
3	23,0
4	23,0

Der klare Überstand wurde mit Hilfe eines Pipettiergerätes abgehebert, und für die Dauer der Messung im Eisbad aufbewahrt.

Die Enzymaktivität wurde wie oben beschrieben im optischen Test nach WARBURG[44] im Photometer Eppendorf bei 25°C gemessen. Nachdem die Extinktionsänderung 0,03 Einheiten überschritten hatte, wurde die Zeit für $\Delta E = 0,1$ abgestoppt.

Als Bezugspunkt wurde die Konzentration an löslichem Protein gewählt. Die Bestimmung erfolgte mit der Biuretmethode nach WEICHSELBAUM[57]; Einsatz 0,4 ml.

Der Testansatz zur Messung der Enzymaktivität hatte folgende Zusammensetzung:

0,05 ml DPNH + H^+	$7,8 \cdot 10^{-3}$ m
0,04 ml DOAP	$1,6 \cdot 10^{-2}$ m
2,7 ml TRA, pH 7,6	$2 \cdot 10^{-1}$ m

Start mit 0,2 ml Überstand

pH 7,6; Temp. 25°C; Wellenlänge 366 mµ

Dieser Ansatz wurde durch Variation der Konzentrationen von Coenzym und Substrat ermittelt und garantiert die Messung der Enzymaktivität unter optimalen Bedingungen.

V. Ergebnisse der Hemmversuche in vivo

Als Bezugspunkt und Vergleichsbasis der Hemmversuche wurde zuerst ein Normbereich ermittelt in dessen Grenzen die Aktivität der α-GDH aus der Leber verschiedener Ratten schwankt. Gesunde Ratten wurden in variierten Zeitabständen nach einer i.p.-Injektion von 1 ccm Ringerlösung pro 100 g Ratte, durch Dekapitieren getötet und eine Leberprobe, wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7. Bestimmung der Aktivitätsschwankungen von α-GDH in der Leber gesunder Ratten.

Messungen in variierten Zeitabständen nach der i.p. Injektion von 1 ccm Ringerlösung pro 100 g Ratte.

i.p. Injektion v. Ringerlösung in Min. vor der Entnahme der Leber		Gew.d.Leberprobe in g	mg Protein pro 100 ml Überstand	spez.Akt. M/ml/h
Minuten	Tierzahl			
5	3	0,202	361	21,9
7,5	5	0,201	285	22,2
10	3	0,207	218,5	22,98
15	3	0,2	285	22,78
20	5	0,198	194,75	23,65
30	2	0,194	192	23,87
60	2	0,217	285	22,78
90	2	0,210	232,75	22,34
120	3	0,214	318,25	23,1
150	2	0,203	194,75	22,67
180	2	0,208	237,5	22,98
300	3	0,209	327,75	22,78

Aus der Tabelle 7 geht hervor, dass die Aktivität der α-GDH aus der Leber verschiedener Ratten nur um einen geringen Betrag schwankt. Voraussetzung dafür ist allerdings die genaueste Einhaltung der einmal gewählten Versuchsbedingungen. Geringfügige Änderungen von einem Versuch zum anderen können Abweichungen von 30 % und mehr bewirken.

Bei entsprechendem Verhalten können die so gewonnenen Werte gut als Grundlage und Vergleichsbasis der folgenden Messungen angenommen werden. Die meisten Werte liegen bei 22,8 M/ml/h bei einer Schwankungsbreite von ± 0,9 M/ml/h.

Im Folgenden soll der Einfluss der oben angegebenen Inhibitorengruppen auf die Aktivität der α-GDH beschrieben werden.

1. Hemmung durch Schwermetalle

Bei den Versuchen in vitro hatte sich herausgestellt, dass das Enzymprotein sehr schnell mit Schwermetallen reagiert. Seine Aktivität wird dabei stark herabgesetzt.

Tabelle 8 zeigt die Wirkung von Zink, PCMB und Kupfer auf die α-GDH-Aktivität in der Leber von Ratten nach i.p. Injektion.

Tabelle 8. Aktivität der α-GDH aus Rattenleber nach i.p. Injektion von Schwermetallsalzlösungen

Messungen 90 Minuten nach der Injektion

Inhibitor Verbindung	Metalldosis in mg/100 g Ratte	mg Protein/100 ml Überstand	spez.Aktivität
$ZnSO_4$	20	308,75	15,4
$ZnSO_4$	40	321,0	12,9
PCMB	20	489,25	11,9
Cu-ac	20	361,0	12,7

Selbst mit den relativ giftigen Salzen von Kupfer und Quecksilber konnte deutliche Hemmung erzielt werden, obwohl

sie nur in niedrigen Dosen angewandt werden konnten.

Die Tiere wurden eine Stunde nach der Injektion getötet und der Überstand der Zentrifugation etwa 30 Minuten später gemessen. Nach der Behandlung mit PCMB und Kupfer war die Aktivität um fast 50 % abgesunken. Nach der Zinkbehandlung liegt die Aktivität geringfügig höher. Mit der Erhöhung der Dosis, der im Falle des Zinks nicht die gleichen Widerstände wie bei den anderen Schwermetallen entgegenstehen, wurden jedoch auch hier die Effekte noch deutlicher.

2. Hemmung durch organische Peroxyde

Die hier eingesetzten Verbindungen zeichnen sich durch geringe Giftwirkung und im Test am isolierten Enzym durch vergleichsweise hohe Hemmeffekte aus.

Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse, welche in vivo mit diesen Substanzen erzielt wurden. Die Tötung der Tiere erfolgte ebenfalls eine Stunde nach der i.p. Injektion und die Messung der Aktivität etwa 30 Minuten später.

Tabelle 9. Hemmung der α-GDH aus Rattenleber nach Injektion organischer Peroxyde

Inhibitor	Dosis in mg	mg Protein / 100 ml Überstand	spezifische Aktivität
α-Hydroxyäthyl-peroxyd	40	285,0	15,7
Bis-hydroxymethyl-peroxyd	40	301,2	16,2
Bis-piperidinomethyl-peroxyd	20	293,1	15,5

Wie die Tabelle 9 zeigt, sind die in vitro noch deutlich sichtbaren Wirkungsunterschiede hier völlig verwischt. Mit α-Hydroxyäthyl-peroxyd ließen sich die Hemmeffekte noch wesentlich steigern, weil diese Verbindung die geringste Giftig-

keit der hier eingesetzten Peroxydinhibitoren besitzt und deshalb die Dosis für das einzelne Tier noch wesentlich erhöht werden kann.

Es ist jedoch auch aus den Ergebnissen des Tierversuches eine deutliche Hemmung abzulesen. Sie beträgt im Durchschnitt etwa 32 %, ist also weniger hoch als die durch Schwermetall gesetzte. Derselbe Unterschied war im gleichen Masse auch bei den Versuchen am isolierten Enzym zu beobachten.

3. Hemmung durch alkylierende Substanzen

Besonders interessant waren bei der hier gewählten Versuchsanordnung die überraschenden in vitro-Ergebnisse dieser Stoffklasse. Es erschien uns durchaus möglich, dass durch die besonderen Verhältnisse im lebenden Organismus etwa der Status der SH-Gruppen und damit auch deren Empfindlichkeit gegen Alkylierungsmittel verändert sein könnte.

Die Ergebnisse dieser Messungen liefen jedoch völlig parallel zu denen in vitro. Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid wurden in einer Dosis von 8 mg pro 200 g Ratte i.p. injiziert; TEM (Farbwerke Höchst) bis zu 1 mg pro 200 g Ratte.

Mit keiner der angewandten Substanzen war eine signifikante Hemmung des Enzyms zu erreichen. Selbst nach Dosen, die nach 4 Stunden für das Tier tödlich wirkten, war die Aktivität des Enzyms unverändert. Ein Ausdehnung der Zeitspanne zwischen Injektion des Alkylierungsmittels und der Tötung des Tieres bis zu 24 Stunden veränderte das Bild nicht.

4. Einfluss der Zeit auf die Hemmintensität

Schon nach wenigen Versuchen an der Ratte zeigte sich, dass eine direkte Beziehung zwischen dem Ausmass der Hemmung und der Einwirkungszeit des Inhibitors bestehen muss. Dieser Zusammenhang sei im folgenden für die beiden wirksamen Hemmstoffklassen (Schwermetalle und organische Peroxyde) beschrieben.

In Abbildung 8 ist dargestellt, wie sich die Hemmwirkung verändert, wenn die Tiere in wachsenden Zeitabständen nach der Injektion getötet werden. Wie aus den Tabellen 8 und 9 ersichtlich ist, bestehen innerhalb der beiden Inhibitorengruppen unter den angeführten Stoffen, keine grundlegenden Unterschiede. So war es möglich aus beiden Gruppen je eine repräsentantive Verbindung auszuwählen. Von den Schwermetallen wurde Zink, von den organischen Peroxyden α-Hydroxyäthyl-peroxyd eingesetzt.

Mit der Peroxydverbindung konnte schon 10 Minuten nach der Injektion eine deutliche Hemmung der α-GDH erreicht werden. Sie stieg dann schnell an um etwa eine Stunde nachher ihr absolutes Maximum zu erreichen. Entsprechend schnell verlief auch ihr Absinken. Zweieinhalb Stunden nach der Injektion war keine Hemmung mehr festzustellen.

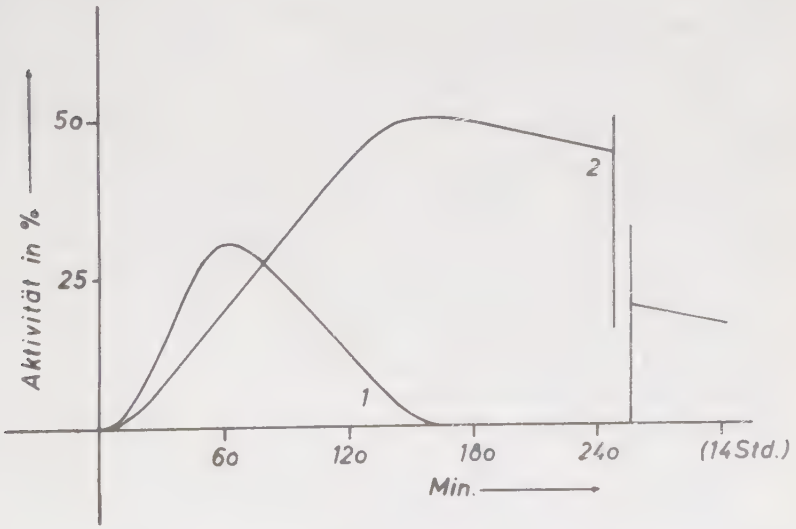


Abb.8. Veränderung der Hemmung bei wachsender Einwirkungsdauer.

Kurve 1 = Peroxyd; Kurve 2 = Schwermetall.

Im Gegensatz hierzu fiel die Aktivität des Enzyms unter der Wirkung von Zink zwar langsamer dafür aber tiefer ab. Diese Hemmung blieb für etwa drei Stunden unverändert bestehen um dann zurückzugehen. Zwölf Stunden nach der Injektion war noch eine deutliche Hemmung messbar.

VI. Gesamtdiskussion

1. Fermenthemmung durch Schwermetallionen

Auf Grund der Kenntnisse vom Aufbau der α-GDH kann die überaus hohe Empfindlichkeit des Fermentes gegen Schwermetalle nur mit der Mercaptidbildung von SH-Gruppen erklärt werden. Dafür spricht besonders die starke Wirkung von PCMB, das als spezifischer SH-Gruppenhemmstoff gilt. Im Laufe der Untersuchungen konnte das Ergebnis VAN EYS[31] bestätigt werden, dass etwa ein Mol PCMB ausreicht um ein Mol α-GDH zu inaktivieren.

Durch starke Hemmung des Enzyms zeichnen sich weiterhin besonders Kupfer und Zink aus. Die für eine vollständige Hemmung nötigen - im Vergleich zum PCMB - höheren Metallkonzentrationen dürften - abgesehen von der Mercaptidbildung - in der Reaktion mit anderen Gruppen des Proteinmoleküls ihre Ursache haben. Hierfür kommen vor allem Histidylreste in Frage.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle ergibt sich aus den restlichen Komponenten des Ansatzes. Als Verbindung mit einem entsprechenden Metallbindungsvermögen muss DOAP in Betracht gezogen werden. Seine Rolle kann mit der eines Schwermetalldepots verglichen werden, dessen Affinität zum Metall jedoch wesentlich kleiner ist als die der proteingebundenen Thiolgruppen.

Einen Masstab hierfür geben die Versuche mit Metallkomplexen. Durch sie liess sich zeigen, dass das Ausmass der Hemmung auch vom Liganden abhängig ist. Nur die ausgesprochen stabilen Zinkkomplexe mit Diamino-diäthyläther-tetraessigsäure und ÄDTA hemmen schwächer. Ihre Affinität zum Metall kann also mit dem Enzym in Konkurrenz treten.

In die gleiche Richtung weisen die Reaktivierungsversuche

mit verschiedenen Komplexbildnern. Die Reaktivierung erfolgt nur dann in hohem Masse wenn der eingesetzte Ligand optimale Komplexbildungseigenschaften bietet; auch ist es nur in diesem Falle möglich ohne grosse Überschüsse auszukommen. Es wurden drei Substanzen mit derartigen Eigenschaften gefunden: ÄDTA; N,N,N',N'-Tetra-kis-amino-äthyläthylen-diamin = Ligand III und N,N'-Bis-(2-picolyl)-äthylendiamin = Ligand V. Alle drei Verbindungen bilden fünfgliedrige Schwermetall-1:1-Komplexe mit 6 bzw. 4 Koordinationsstellen.

In den Liganden III und V fanden sich zwei Komplexbildner, die auch in ihren aktivierenden Eigenschaften auf das ungehemmte Enzym dem ÄDTA zumindest gleichwertig sind. Dieser Effekt ist für ÄDTA in der Enzymchemie allgemein und im besonderen für die α-GDH [30)33)] seit längerer Zeit bekannt. Neue Substanzen gleicher Wirkung fanden sich bisher in der Literatur nicht.

Die Erhöhung der Enzymaktivität beruht höchstwahrscheinlich auf dem Abfangen von Schwermetallverunreinigungen, es werden aber auch andere Mechanismen diskutiert.

Von den eingesetzten Metallen kommen Quecksilber, Cadmium und Nickel normalerweise nicht in der lebenden Zelle vor; als zellvertraut können Kupfer, Kobalt und Zink bezeichnet werden. Von den letzteren wiederum findet sich Zink in den höchsten Konzentrationen. Normale Zellen erreichen durchschnittlich etwa Zinkkonzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-4}m, also bis zu 65 γ. Bei Kupfer und Kobalt liegen die Werte ungefähr zwei Zehnerpotenzen tiefer. Die Zinkkonzentrationen sind also in der Zelle höher als diejenigen, welche zur völligen Inaktivierung in vitro nötig sind. Eine Regulierung des Baranowski-Enzyms in vivo durch Zink sollte also möglich sein, konnte aber mit den bisherigen Versuchen nicht bewiesen werden.

Die Verminderung der Aktivität der α-GDH durch Schwermetalle entspricht dem Typ der kompetitiven Hemmung. Dieser Befund bestätigt auch bei diesem Enzym die Annahme, dass SH-Gruppen für die Bindung von Coenzym und Substrat von ausschlaggebender Bedeutung sind.

2. Hemmung durch organische Peroxyde und Peroxyhydrate

Vergleicht man die Wirkung der in dieser Arbeit verwendeten organischen Persauerstoffverbindungen auf die α-GDH mit der von Schwermetallen, so fallen wesentliche Unterschiede zwischen beiden Hemmstoffklassen auf. Für die Schwermetalle gelten folgende Charakteristika: Sofortige Hemmung ohne Vorinkubation, geringer Zeiteinfluss auf die Intensität der Hemmung, einseitige Wirkung des Liganden (nur Verringerung der Hemmwirkung bei hoher Komplexstabilität).

Andere finden sich bei der zweiten Hemmstoffklasse. Bei Sofortstart mit Enzym ist bei keiner der eingesetzten Persauerstoffverbindungen eine Hemmung zu erzielen. Die Vorinkubationszeit spielt also hier die ausschlaggebende Rolle. Der Grund hierfür liegt in der verschieden schnellen Freisetzung der eigentlich hemmenden Perverbindung. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann durch den Thiazolidintest[12] ermittelt werden.

Schliesslich kommt hinzu, dass das Ausmass der Hemmeffekte durch den organischen Träger deutlich variiert wird und zwar in beiden Richtungen. Je nach Art des Substituenten kann Verstärkung oder Abschwachung beobachtet werden. Die Substitution mit Piperidylresten zum Beispiel bewirkt eine Verstärkung der Wirkung des Bis-Hydroxymethyl-peroxyds; die n-Butyl-Gruppe dagegen bringt keine grosse Veränderung und der t-Butyl-Rest als abschirmende und stabilisierende Gruppierung ergibt eine Abschwächung.

Beim Vergleich mit der Schwermetallhemmung fällt weiter auf, dass die Hemmintensität der Peroxyde ganz erheblich geringer ist. Lediglich α-Hydroxymethyl-peroxyd ist grössenordnungsmässig mit den Metallhemmungen vergleichbar. Bei der grossen Oxydationsempfindlichkeit freier SH-Gruppen liegt der Schluss nahe, dass die Thiolgruppen des Baranowski-Enzyms unter den gegebenen Verhältnissen in „maskierter" Form vorliegen. Diese Vermutung wird später bei der Diskussion der Befunde mit Alkylierungsmitteln zu besprechen sein. Sollten die SH-Gruppen maskiert vorliegen so können sie in diesem Fall offensichtlich der Oxydation nicht völlig entgehen.

Der Hemmtyp entspricht auch hier der konkurrierenden Hemmung.

Erwartungsgemäss ergab sich ein weiterer grundlegender Unterschied zur Schwermetallhemmung bei den Reaktivierungsversuchen. Volle Aktivität ist nach Metallhemmung immer zu erreichen und zwar ausser beim Quecksilber, mit relativ geringem Überschuss an Reaktivator. Nach Peroxydhemmung dagegen bleibt immer ein gewisser Rest irreversibler Aktivitätsminderung bestehen, auch wenn noch so hohe Cysteinkonzentrationen zugegeben werden. Es ist anzunehmen, dass SH-Gruppen zu Schwefelderivaten oxydiert werden, die vom Cystein nicht mehr reduziert werden können.

3. Hemmversuche mit Alkylierungsmitteln

Die Ergebnisse dieser letzten Inhibitorengruppe unterscheiden sich grundsätzlich von den vorangegangenen. Mit keiner der eingesetzten Substanzen konnte eine echte Hemmung erzielt werden. Dabei wurden Inhibitorkonzentrationen bis zu 10^{-3}m gewählt und die Vorinkubation auf maximal zwei Stunden ausgedehnt. Werden die Konzentrationen weiter erhöht, so tritt schlagartig eine Verminderung der Enzymaktivität auf. Von einer Hemmung kann aber in diesem Falle nicht mehr gesprochen werden. Bei geeignet gewählten Konzentrationsverhältnissen Inhibitor - Enzym können deutliche Niederschläge von denaturiertem Eiweiss beobachtet werden. Die Denaturierung konnte nur bei den Inhibitoren der Maleinimidgruppe beobachtet werden; Jodacetat und Jodacetamid blieben auch in Konzentrationen über 10^{-3}m wirkungslos.

Ein derartiges Verhalten eines SH-Gruppenfermentes ist von verschiedenen Autoren bereits beschrieben worden. BRUCHMANN[28] zeigte, dass ein roher Fermentextrakt aus dem „Fettpilz" Endomycopsis vernalis zwar durch PCMB gehemmt, durch Jodacetat nicht angegriffen wird. Im Stoffwechsel dieses Pilzes spielt die α-GDH eine wichtige Rolle.

Auch PFLEIDERER et al.[55] fanden bei ihren Untersuchungen an der LDH, dass Jodacetat und Jodacetamid keine Vermin-

derung der Fermentaktivitäten bewirken. Sie erklären dieser Befund mit einer Maskierung der SH-Gruppen, die eine Reaktion mit dem Alkylierungsmittel unmöglich macht.

Ein solcher Mechanismus wäre im Falle der α-GDH ebenfalls denkbar ohne durch die Ergebnisse mit den beiden anderen Hemmstoffgruppen widerlegt zu werden. Die Affinität der Thiolgruppen ist zu Schwermetallen bei weitem am stärksten; die Hemmung wird dadurch begünstigt. Der Peroxydhemmung kommt eine andere Eigenschaft der SH-Gruppen entgegen: Ihre ausserordentliche Oxydationsempfindlichkeit. Aber auch schon hier macht sich am Ausmass der Hemmung eine schützende Gruppierung bemerkbar. Die unspezifischer wirkenden Alkylierungsmittel schliesslich, sind nicht mehr in der Lage die abschirmende Gruppe zu verdrängen.

Bei den Versuchen mit organischen Peroxyden am Mäuseascitescarcinom in vivo[12] fielen einige Verbindungen durch besonders starke Wirkung auf. Es zeigte sich, dass sie neben dem oxydierenden auch alkylierenden Einfluss nahmen. Die Aktivität der α-GDH setzten sie jedoch nicht besonders herab, vermutlich deshalb, weil hier die Oxydation nicht durch die Alkylierung ergänzt oder verstärkt werden kann.

4. Tierversuche

Die vorangegangenen Aussagen fanden eine Bestätigung und Erweiterung durch die Ergebnisse der Tierversuche. Das aus der Leber von Ratten extrahierte Baranowski-Enzym war auch unter den Bedingungen des lebenden Organismus gegen Schwermetalle hoch empfindlich. Obwohl wegen der wichtigen Eigenschaften dieser Stoffklasse der Dosis Grenzen gesetzt waren, liess sich 50-proz. Hemmung der ursprünglichen Aktivität erreichen. Bei der Bewertung dieser Zahl im Vergleich zum Test in vitro muss berücksichtigt werden, dass ein gewiss beträchtlicher Anteil des injizierten Inhibitors nicht am Protein der α-GDH zur Wirkung kommt. Eine Vielzahl von Verbindungen mit SH-Gruppen steht mit der α-GDH in Konkurrenz um das Metall, so dass der Wirkungsgrad in vitro und in vivo auch quantitativ vergleichbar wird.

Die zweite am isolierten Enzym wirksame Stoffklasse bildet die der organischen Peroxyde. Die dort mit ihnen erzielten Ergebnisse stehen in voller Übereinstimmung mit den Befunden des Tierversuches. Für die 30-proz. Hemmung des Enzyms in vivo durch Persauerstoffverbindungen gilt das schon bei der Schwermetallhemmung Angeführte. Auch unter den geänderten Bedingungen dieser Versuchsanordnung kam eine alkylierende Nebenwirkung der eingesetzten Substanzen nicht zum Ausdruck.

Schliesslich bestätigte sich auch im in vivo-Versuch die Unwirksamkeit der alkylierenden Verbindungen. Durch stufenweise Verlängerung der Vorinkubation von 15 Minuten bis 24 Stunden konnte ausgeschlossen werden, dass die Messungen vor Erreichen des Wirkungsoptimums abgeschlossen worden waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die im Gegensatz zum in vitro-Test wesentlich komplexere Verhältnisse am Ganztier keine Änderung der Reaktivität der SH-Gruppen und damit der Hemmbarkeit des Fermentes bedingen.

Neu ist beim Tierversuch lediglich die Tatsache, dass der lebende Organismus in der Lage ist, einem Eingriff von aussen entgegenzuwirken. Dies kommt im langsameren Wirkungseintritt der Schwermetalle zum Ausdruck. Die Schwierigkeit derartiger Stoffe in die Zelle einzudringen ist bekannt. Die logische Folge ist ein langsames Abklingen der Hemmung wenn der Eintritt einmal erfolgt ist und nun die Zellwand für die Ausscheidung ein erneutes Hindernis darstellt.

Werden organische Peroxyde als Inhibitoren verwendet, so ist ein schneller Anstieg und ein ebens. schnelles Abfallen der Hemmung zu beobachten. Die Barriere der Zellwand ist für diese Substanzen leichter zu überwinden, und die sehr oxydationsempfindlichen SH-Gruppen können schnell erfasst werden. Das schnelle Abklingen der Hemmwirkung konnte eventuell durch das Vorhandensein von proteinogenem Cystein oder Glutathion erklärt werden. Wie schon im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde sind derartige Verbindungen sehr wohl imstande die Aktivität des peroxydgehemmten Enzyms zu reaktivieren.

E. Zusammenfassung

Die Einwirkung von Schwermetallen, organischen Peroxyden und Alkylierungsmitteln auf die α-GDH wurde mit Hilfe des optischen Verfahrens in vitro und in vivo untersucht.

Schwermetalle hemmen das isolierte Enzym am stärksten; es ist gegen Merkaptidbildung hochempfindlich. Die Verminderung der Fermentaktivität durch steigende Inhibitorkonzentrationen wird durch Hemmkurven dargestellt.

Die Hemmintensität von Metallkomplexen steht in direkter Beziehung zur Komplexstabilität.

Organische Peroxyde bewirken ebenfalls eine Verminderung der Aktivität. Der Einfluss verschiedener Substituenten am Peroxydmolekül ist unverkennbar. Die spezifische Wirkung dieser Substituenten wird diskutiert.

Alkylierungsmittel rufen innerhalb sinnvoller Konzentrationen keine Hemmung hervor. Eine Erklärung bietet die Annahme maskierter SH-Gruppen in schwach alkalischem Milieu.

Das metallgehemmte Enzym ist durch geeignete Stoffe voll reaktivierbar. Der Zusammenhang zwischen der chemischen Konstitution der Reaktivatoren und deren Wirkung wird besprochen.

Auch die Hemmung durch organische Peroxyde kann rückgängig gemacht werden, jedoch bleibt ein kleiner Rest irreversibler Aktivitätsminderung.

Für die beiden aktiven Inhibitorenklassen wurden die Hemmtypen bestimmt.

Mit Hilfe einer einfachen Versuchsanordnung wird gezeigt, dass die α-GDH auch innerhalb einer lebenden Organisation gleich reagiert wie als isoliertes Enzym.

Sowohl durch i.p. Injektionen von Schwermetallsalzlösungen als auch organischer Peroxyde ist es möglich das Ferment in der Leber von Ratten stark zu hemmen.

Die Unterschiede in Wirkungseintritt und Wirkungsdauer zwischen den beiden Inhibitorengruppen werden aufgezeigt und diskutiert.

F. Literatur

1) B.Vallee u. F.Hoch, J.Amer.chem.Soc. 77, 821 (1955)
2) K.Wallenfels, H.Sund, A.Faessler u. W.Burchard, Bioch.Z. 329, 31 (1957)
3) K.Wallenfels, H.Sund, Angew.Chem. 67, 517, 787 (1955)
4) K.Wallenfels, H.Sund, Bioch.Z. 329, 59 (1957)
5) H.Mahler u. J.Douglas, J.Amer.chem.Soc. 79, 1159 (1957)
6) J.v.Eys, N.Kaplan u. M.Ciotti, Biochim.biophys.Acta (Amsterdam) 23, 574 (1957)
7) G.Weitzel u. Th.Spehr, Hoppe Heyler's Z.Physiol.Chem. 313, 212 (1958)
8) H.Theorell u. J.S.Mc Kinley Mc Kee, Nature 192, 4797, 47 (1961)
9) G.Weitzel u. W.Schaeg, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 316, 250 (1959)
10) G.Weitzel u. E.Buddecke, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 317, 150 (1959)
11) G.Weitzel, E.Buddecke u. F.Schneider, Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 323, 211 (1961)
12) G.Weitzel, E.Buddecke, F.Schneider u. H.Pfeil, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 325, 65 (1961)
13) G.Weitzel, E.Buddecke u. F.Schneider, Angew.Chem. 72, 920 (1960)
14) G.Bolz, Dissertation Tübingen, 1961
15) A.Fischer, Dissertation Tübingen, 1961
16) O.Meyerhof, Ergebn.Physiol. 39, 10 (1937)
17) O.Meyerhof, Pflüger's Arch. ges. Physiol. 175,20 (1919)
18) D.E.Green, Biochem.J. 30, 629 (1936)
19) D.E.Green u. J.G.Devan, Biochem.J. 31, 1069 (1937)
20) J.G.Devan u. D.E.Green, Biochem.J. 31, 1074 (1937)
21) T.C.Tung, L.A.Anderson u. H.A.Lardy, Arch.Biochem. Niophys. 40, 194 (1952)

22) E.Zebe, A.Delbrück u. Th.Bücher, Ber.ges.Physiol.exp. Pharmakol. 189, 115 (1957)
23) E.Zebe, A.Delbrück u. Th.Bücher, Angew.Chem. 69,65 (1957)
24) B.Sacktor u. D.G.Cochran, Biochim.biophys.Acta (Amsterdam) 26, 200 (1957)
25) H.v.Euler, E.Adler u. G.Günther, Z.Physiol.Chem. 249, 1 (1937)
26) E.Schmid u. F.W.Schmid, Klinische Wochenschrift 38, 957 (1960)
27) E.Zebe u. W.H. Mc Shan, J.gen.Physiol. 40, 779 (1957)
28) E.E.Bruchmann, Zbl.Bakteriol. II 112, 421
29) T.Baranowski, J.Biol.Chem. 180, 535 (1949)
30) G.Beisenherz, H.J.Boltze, Th.Bücher, R.Czok, K.H.Garbade, E.Meyer-Arendt u. G.Pfleiderer, Z.Naturforsch. 8b, 555 (1959)
31) J.v.Eys, B.J.Nuenke u. M.K.Patterson, J.Biol.Chem. 234, 2308 (1959)
32) L.W.Cunningham u. B.J.Nuenke, J.Biol.Chem. 234, 1447 (1959)
33) H.Ankel, Th.Bücher u. R.Czok, Biochem.Z. 332, 315 (1960)
34) P.D.Boyer, J.Amer.chem.Soc. 76, 4331 (1954)
35) H.L.Young u. N.Pace, Arch.Biochem.Biophys. 75, 125 (1958)
36) Th.Bücher u. M.Klingenberg, Angew.Chem. 70, 552 (1958)
37) E.Zebe, Experientia (Basel) 12, 68 (1956)
38) V.Kubista, Biochem.Z. 330, 315 (1958)
39) B.Sacktor u. R.Estabrook, Fed.Proc. 17, 301 (1958)
40) R.W.Estabrook, B.Sacktor u. B.Chance, XVth Internat. Congress of Zoology, Sect.VI, Paper 57
41) A.L.Lehninger, Harvey Lectures 12, 176 (1955)
42) H.Lineweaver u. D.Burk, J.Amer.chem.Soc. 56, 658 (1934)
43) G.E.Glock u. P. Mc Lean, Biochem.J. 61, 388 (1955)
44) O.Warburg, Ergebn.Enzymforsch. 7, 210 (1938)
45) E.L.Smith u. J.R.Kimmel, The Enzymes, 2.Aufl. 1960, Bd.4, S.147.
46) F.P.Martinenko, Ukrain.Biochem.J. 33, 693 (1961)
47) R.L.Hill u. E.L.Smith, Fed.Proc. 14, 226 (1955)
48) E.L.Smith u. R.L.Hill, Proc. 3rd Intern. Congress Biochem. Brüssel (1955)

49) R.L.Hill u. E.L.Smith, Biochim.biophys.Acta 19, 376 (1956)
50) D.Grünwedel, Diplomarbeit Tübingen, 1961
51) L.Michaelis u. M.P.Schubert, J.Biol.Chem. 106, 331 (1934)
52) E.Roberts u. G.Rouser, Analytical Chem. 30, 1291 (1958)
53) J.D.Gregory, J.Amer.chem.Soc. 77, 3922 (1955)
54) E.Friedmann, Biochem.Biophys.Acta 9, 65 (1952)
55) G.Pfleiderer, D.Jeckel u. Th.Wieland, Biochem.Z. 330, 296 (1958)
56) E. u. F.W.Schmidt, Klinische Wochenschrift 19,957 (1960)

L e b e n s l a u f

Am 9.Mai 1934 wurde ich als Sohn des Steuerrates Hans N a g l e r und seiner Ehefrau Else, geb. Weber, in Würzburg geboren. Nach dem Besuch der Volksschule und der Oberrealschule Würzburg legte ich am 14.Juli 1953 die Reifeprüfung an der Oberrealschule in Bamberg ab. Im April 1954 begann ich als Praktikant in der Marienapotheke in Ravensburg mit der Ausbildung zum Apotheker. Am 16.März 1956 legte ich die Pharmazeutische Vorprüfung vor dem Prüfungsausschuss am Innenministerium Stuttgart ab und begann anschliessend im Sommersemester 1956 mit dem Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen. Vom Wintersemester 1956/57 studierte ich an der Universität Tübingen, wo ich am 22.Juli 1959 die Pharmazeutische Prüfung ablegte.

Bis zum Sommersemester 1960 arbeitete ich als Kandidat der Pharmazie in der Löwen-Apotheke in Freudenstadt. Anschliessend begann ich meine Promotionsarbeit am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. G. Weitzel. Die Arbeit wurde im Oktober 1962 abgeschlossen.

Seit zwei Jahren bin ich verheiratet und habe eine einjährige Tochter.

Meine akademischen Lehrer waren vor allem die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Pharmazeutische Chemie:	Hückel, Auterhoff (Tübingen)
Anorganische Chemie:	Neuwsen (Erlangen), Rüdorff (Tübingen)
Organische Chemie:	Eugen Müller, Hellmann (Tübingen)
Physiologische Chemie:	Butenandt, Weitzel (Tübingen)
Botanik:	Schwemmle (Erlangen), Bünning, Zimmermann, Mägdefrau (Tübingen)
Pharmakologie:	Siess, Lembeck (Tübingen)
Physik:	Krüger (Tübingen)
Pharmakognosie:	Hummel (Tübingen)

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen